

WO0158448

Title:
APOPTOSIS INHIBITOR

Abstract:

An apoptosis inhibitor which contains as the active ingredient 5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone represented by the formula (1); and an inflammatory cytokine production regulating agent, a poly-ADP-ribose-polymerase inhibitor and a JNK and/or p38 MAPK inhibitor each containing this compound as the active ingredient.

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年8月16日 (16.08.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/58448 A1

(51) 国際特許分類7:
43/00, 1/16 // C07D 213/64

A61K 31/4412, A61P

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 隆二
(SUZUKI, Ryuji) [JP/JP]. 奥 久司 (OKU, Hisashi)
[JP/JP]; 〒566-0022 大阪府摂津市三島2丁目5番1号
塩野義製薬株式会社内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP01/00935

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2001年2月9日 (09.02.2001)

(25) 国際出願の言語:

日本語

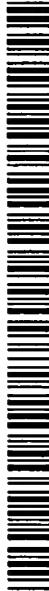
(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-38048 2000年2月9日 (09.02.2000) JP

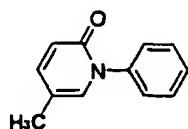
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

/統葉有/



(54) Title: APOPTOSIS INHIBITOR

(54) 発明の名称: アポトーシス阻害剤



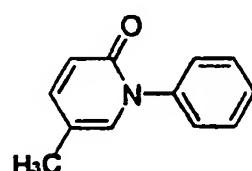
1

(57) Abstract: An apoptosis inhibitor which contains as the active ingredient 5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone represented by the formula (1); and an inflammatory cytokine production regulating agent, a poly-ADP-ribose-polymerase inhibitor and a JNK and/or p38 MAPK inhibitor each containing this compound as the active ingredient.

(57) 要約:

下記式(1)で表される5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを有効成分として含む、アポトーシス阻害剤を提供する。本発明はまた、この化合物を有効成分とする、炎症性サイトカインの產生抑制剤、ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼ阻害剤、並びにJNKおよび/またはp38 MAPKの阻害剤を提供する。

式(1):



1

WO 01/58448 A1



(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書
2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

明細書

アポトーシス阻害剤

技術分野

本発明は、アポトーシス阻害剤、炎症性サイトカイン産生抑制剤、ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼの阻害剤、並びに Jun-キナーゼおよび／または MAP キナーゼ阻害剤に関する。

背景技術

アポトーシスは、カスパーゼの活性化によってもたらされる細胞死である。発生やホメオスタシスの過程で認められるプログラム細胞死だけでなく、多くの疾患にアポトーシスの関与していることが知られている。たとえば癌は、異常をきたした細胞のアポトーシス誘導機構が破綻した結果として生じた状態であると説明することができる。逆にアポトーシスの病的な亢進は、組織の萎縮をもたらす。

アポトーシスの起きる仕組みが明らかになるにつれて、様々な疾患とアポトーシスの関連性が疑われるようになった。そして、アポトーシスの制御によって、これらの疾患の治療や予防が可能となることが推測されている。たとえば、肝炎症状や移植片対宿主病(GVHD)では、パーフォリンや Fas リガンド (以下、FasL と省略する) の病態への関与が示唆されている。すなわち、Fas と FasL との結合の阻害が、肝炎症状の軽減につながるという報告がある。また GVHD モデル動物の生存率が、抗 FasL 抗体の投与によって改善された (実験医学 vol.17, No. 13, pp. 1635-1641, 1999)。

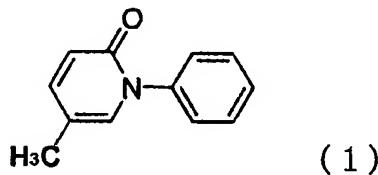
このように、アポトーシスに関する因子の働きを阻害し、アポトーシスを制御することができる化合物が提供されれば、アポトーシスの関与が疑われる疾患の新しい治療剤として有用である。アポトーシスを誘導する様々な因子が単離され、その全容は少しづつ明らかにされつつあると言って良い。たとえば細胞障害

- 2 -

性リンパ球は細胞外から標的細胞のアポトーシスを誘導する。このとき作用する因子が、FasL である。これらの因子を効果的にブロックすることができれば、アポトーシスの制御が実現する。しかしながら、アポトーシス関連因子を作用点とする医薬品の候補化合物は多くは報告されていない。

一方、肺や動脈硬化巣などにおける線維化に対して式（1）で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンが治療効果を示すことが知られている（特公平 5-52814）。この化合物は、一般名を「ピルフェニドン」(pirfenidone)と名付けられた。またその誘導体についても、同様の作用が報告されている（特表平 8-510251）。式（1）で示される化合物であるピルフェニドンは、古くは呼吸器や皮膚における炎症症状の治療に有用な化合物として報告された（USP3974281、USP4042699、USP4052509）。その後、抗線維化作用に着目され、肺線維症を適用とする医薬品として開発途上にある化合物である（Nicod, LP. Lancet, Vol.354, July 24, 1999, p268-269）。

式（1）：



ピルフェニドンによる抗線維化作用については、これまでに以下のような知見が得られている。

- ・線維化を亢進するサイトカインの作用を抑制 (Lurton JM et al., Am J Respir Crit Care Med. 153:A403.1996) 、
- ・シクロフォスファミドにより誘導されるマウス肺の線維化を低減する作用や、ブレオマイシンによるハムスターの肺変化を抑制 (Kehrer and Margolin (1997) Toxicol.Lett. 90 125; Schelegle et al (1997) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 216 392) 、

- 3 -

・コラーゲンの過剰産生を抑制 (Iyer et al (1999) *J.Pharmacol.Exp. Ther.* 289 211) 、

・腫瘍壞死因子 α (TNF- α) の合成および放出を抑制 (特表平 11-512699) 。

このような作用を基に、現在、ピルフェニドンは肺線維症、硬化性腹膜炎、強皮症、子宮平滑筋腫の治療薬として開発が進められている。しかしながら、ピルフェニドンによる抗線維化作用とアポトーシス関連因子との関係については未知である。

TNF- α は、アポトーシス誘導因子に位置付けられる。また肝炎による肝組織障害に果たす TNF- α の役割が重要であることも示唆されている (Guidotti L., et al., *Immunity*, 4:25-36, 1996, Kondo T., et al., *Nature Med.*, 3:409-413, 1997, Seino K., et al., *Gastroenterology*, 113:1315-1322, 1997)。これらの報告に基づけば、ピルフェニドンの肝線維化の抑制作用を TNF- α の産生抑制で説明することもできるかもしれない。しかしピルフェニドンの抗線維化作用をはじめとする既知の薬理作用を、TNF- α の産生抑制効果のみで説明することはできない。したがって、ピルフェニドンには、更に解明しなければならない作用機作が残されている。

発明の開示

本発明は、新規なアポトーシス阻害剤、炎症性サイトカイン産生抑制剤、ボリ-ADP-リボース-ポリメラーゼの阻害剤、並びに Jun-キナーゼおよび／または MAP キナーゼ阻害剤の提供を課題とする。

本発明者らは、線維化という病態を慢性的な炎症の結果と仮定した。この仮定によれば、ピルフェニドンによる抗線維化作用は、炎症症状の抑制効果の結果によるものと考えることができる。これらの一連の仮定に基づいて、人為的に起きた炎症状態に対して、ピルフェニドンを投与し、その影響を詳細に解析することにより、ピルフェニドンの作用機構をより詳細に解析することができると考え

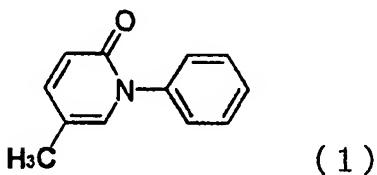
た。人為的な炎症のモデルとしては、細菌性のリボ多糖（以下 LPS と省略する）によって誘導される、マウス肝の急性肝炎モデルを選択した。このモデルは、激しい肝炎症状が急激に表れることから、急性肝炎のモデルとして有用である。

このような解析を通じ、本発明者らは、ビルフェニドンに、LPS 誘導肝炎の治療効果や予防効果を確認した。更に本発明者らは、このような効果をもたらしているビルフェニドンの作用機構を探索し、標的分子を明らかにした。そして本発明者らは、これらの標的分子がいずれもアポトーシス関連因子であることを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下のアポトーシス関連因子の阻害剤、炎症性サイトカイン産生抑制剤、ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼの阻害剤、並びに Jun-キナーゼおよび／または MAP キナーゼ阻害剤の提供に関する。

〔1〕式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、アポトーシスの阻害剤。

式 (1) :



〔2〕前記式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、インターロイキン 12、インターロイキン 18、およびインターフェロンγからなる群から選択される炎症性サイトカインの産生抑制剤。

〔3〕前記式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼの阻害剤。

〔4〕前記式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、Jun-キナーゼおよび／または p38 MAP キナーゼ阻害剤。

- 5 -

〔5〕〔1〕に記載のアポトーシス阻害剤を主成分として含有するアポトーシスに起因する疾患の治療剤。

〔6〕前記式（1）で示される5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、肝炎の治療剤。

〔7〕肝炎が劇症肝炎である〔6〕に記載の治療剤。

〔8〕〔3〕に記載のポリ-ADP-リポース-ボリメラーゼの阻害剤を主成分として含有するネクロシスに起因する疾患の治療剤。

〔9〕疾患が急性肝炎である〔8〕に記載の治療剤。

また本発明は、前記式（1）で示される5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを含む医薬製剤をヒト、またはヒト以外の動物に投与する工程を含む、ヒト、またはヒト以外の動物における以下の疾患の治療および／または予防方法に関する。特に本発明は、以下の疾患が発症した後に、前記式（1）で示される5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを含む医薬製剤を投与する工程を含む、以下の疾患の治療方法に関する。あるいは本発明は、前記式（1）で示される5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンの、以下の疾患の治療剤の製造における使用に関する。

アポトーシスに起因する疾患

肝炎

劇症肝炎

ネクロシスに起因する疾患

急性肝炎

また本発明は、前記式（1）で示される5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを含む医薬製剤をヒト、またはヒト以外の動物に投与する工程を含む、ヒト、またはヒト以外の動物における、インターロイキン12、インターロイキン18、およびインターフェロンγからなる群から選択される炎症性サイトカインの產生抑制方法に関する。あるいは本発明は、前記式（1）で示される

- 6 -

5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンの、ヒト以外の動物における、インターロイキン12、インターロイキン18、およびインターフェロン γ からなる群から選択される炎症性サイトカインの產生抑制剤の製造における使用に関する。

更に本発明は、前記式(1)で示される5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを含む医薬製剤をヒト、またはヒト以外の動物に投与する工程を含む、ヒト、またはヒト以外の動物における以下の酵素の活性阻害方法に関する。あるいは本発明は、前記式(1)で示される5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンの、ヒト、またはヒト以外の動物における以下の酵素の阻害剤の製造における使用に関する。

ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼ

Jun-キナーゼおよび/またはp38 MAPキナーゼ

本発明において有効成分として利用される前記式(1)の化合物は、一般名ピルフェニドンとして公知である(USP3839346)。例えば、特開平49-87677号公報に記載された方法に従って合成することができる。

〔1〕炎症性サイトカインの產生抑制剤

本発明は、まず前記式(1)で示される5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドン、すなわちピルフェニドンを主成分として含有する、インターロイキン12(以下IL-12と省略する)、インターロイキン18(以下、IL-18と省略する)、およびインターフェロン γ (以下、IFN- γ と省略する)からなる群から選択される炎症性サイトカインの產生抑制剤に関する。IL-12は主に単球やマクロファージで、IL-18は主にマクロファージやクッパー細胞で、またIFN- γ は主にT細胞やNK細胞で產生される炎症性のサイトカインである。この他にもIFN- α 、IFN- β 、TNF- α 、TNF- β 、IL-1 α 、IL- β 、IL-5、IL-6、あるいはIL-10等が炎症性サイトカインとして知られている。

哺乳動物がLPSの投与によって激しい急性炎症症状を生じることは周知である。

る。哺乳動物の腹腔に LPS を投与すると、まず TNF- α の產生が起きる。TNF- α は IL-12 や IL-18 の產生をもたらし、更にこの 2 つのサイトカインが IFN- γ 產生を誘導する。IFN- γ は Fas と FasL を誘導する結果、肝臓で急激な肝細胞アポトーシスが誘導され、アポトーシスを伴った齶血性壞死により肝不全に陥る(Tsutsui, H., et al. 1997. IL-18 Accounts for Both TNF- α - and Fas Ligand-mediated Hepatotoxic Pathways in Endotoxin-Induced Liver Injury in Mice. *J. Immunol.* 159:3961.)。このサイトカインの一連の流れは、同じく急性炎症で上昇することが知られている IL-1、IL-6、IL-8、GM-CSF などの上昇よりも重要であることが報告されている(Ozman, L., et al. 1994. Interleukin 12, interferon γ , and tumor necrosis factor α are the key cytokines of the generated Shwarzman reaction. *J. Exp. Med.* 180:907, Wysocka, M., et al. 1995. Interleukin 12 is required for interferon γ production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur. J. Immunol.* 25: 672)。

先に述べたようにピルフェニドンには既に TNF- α の產生抑制作用が報告されているが、本発明者らはピルフェニドンが TNF- α のみならず、IL-12、IL-18、そして IFN- γ に対してもその產生抑制作用を持つことを明らかにした。しかも、本発明者らが得た知見によれば、ピルフェニドンは、同じく炎症性サイトカインである、IL-1 や IL-6 等に対しては抑制作用が弱い。たとえば、IL-12 の產生抑制作用と比較すると、50% 以下となる。したがって、ピルフェニドンの急性炎症における抑制効果は TNF- α 、IL-12、IL-18、IFN- γ というこの 4 種の炎症性サイトカイン產生に対する抑制効果によるもの、と考えられる。

さて、ここで説明したサイトカインの一連の流れにおいては、TNF- α が最も上流に位置することに注意しなければならない。つまり、ピルフェニドンの炎症性サイトカイン抑制作用は、TNF- α の產生抑制の結果として表れている可能性がある。しかし本発明者らの知見によれば、ピルフェニドンによる炎症性サイト

- 8 -

カインの産生抑制作用は、間接的なものではない。例えば、LPS 投与による TNF- α 産生のピークは LPS 投与後 1.25 時間であり、3 時間後には血中から検出されなくなるにも関わらず、ピルフェニドンは LPS 投与マウスの致死防御に関して、血中 TNF- α 産生が過ぎてしまってから投与しても（例えば LPS 投与後 3 および 4 時間後）、致死を防御できる（実施例 3）。

また、ピルフェニドンは、TNF- α 産生が終わった後でも IFN- γ 等の炎症性サイトカインの産生を抑制する（実施例 9）。さらに、ピルフェニドンは TNF- α とは別にネクローシスおよびアポトーシスを阻害する（実施例 10）。このようにピルフェニドンは、TNF- α が放出された後でも急性炎症性ショックを抑制できるという特徴を有している。さらに、ピルフェニドンは、LPS 投与後 4 時間が経過した後でも、ポリ-ADP-リボシル化、および NAD 量の低下を抑制する（実施例 11）。ピルフェニドンによるこれらの効果は、抗 TNF- α 抗体などによる防御が、TNF- α が大量に血中に放出された後に自動的に進む反応を抑えることができないのとは対照的である。以上のことから、ピルフェニドンによるこれらの作用は、単に TNF- α の作用を抑制する結果として表われているものではないことは明らかである。

本発明の炎症性サイトカイン産生抑制剤により産生を抑制されるサイトカインは、いずれも T ヘルパー 1 タイプのサイトカインである。したがって、本発明の炎症性サイトカイン産生抑制剤は、T ヘルパー 1 タイプのサイトカイン産生の亢進が原因となっている疾患であって、特に IL-12、IL-18、および IFN- γ の産生の亢進を原因とするものに有効である。T ヘルパー 1 タイプのサイトカインとは、炎症性サイトカインのうち、T ヘルパー 1 タイプの免疫応答の誘導に関するサイトカイン群の総称である。T ヘルパー 1 タイプのサイトカインには、T ヘルパー 1 細胞の分化を誘導するサイトカインおよび T ヘルパー 1 細胞が産生するサイトカインが含まれる。T ヘルパー 1 細胞の分化を誘導するサイトカインとしては、具体的には、IL-12 および IL-18 等が含まれる。これらのサイトカインは、T ヘ

- 9 -

ルパー1タイプの免疫応答の誘導に関与している (Xu, B. et al. *J. Exp. Med.*, 188: 1485, 1998、および Takeda, K. et al. *Immunity.*, 8: 383-390, 1998)。また、Tヘルパー1細胞が産生するサイトカインとしては、具体的には、IL-2 および IFN- γ 等が含まれる (臨床免疫, 第30巻, 第11号, p1471-1478, 1998)。

Tヘルパー1/Tヘルパー2バランスの不均衡は、免疫病発症の一因になると考えられている。Tヘルパー1型免疫に偏った場合には、細胞性免疫が増強され癌や感染症に対する免疫応答は高まる半面、同時に自己傷害性も高まり免疫病発症の原因の一つとなる。したがって本発明による炎症性サイトカインの産生抑制剤は、たとえばTヘルパー1タイプの免疫応答の過剰が原因で起こると言われているすべての疾患に対して有効性が期待できる。一般に臓器特異的自己免疫疾患は、Tヘルパー1タイプの免疫応答への偏りが原因とする考え方がある。具体的には、糖尿病、肝障害、自己免疫性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、移植片対宿主病 (GVHD)、関節炎、甲状腺炎、橋本病、外分泌腺炎、細胞内感染症 (リューシュマニア、結核菌、ライ菌)、遅延型過敏症、強皮症、あるいはペーチェット病等を示すことができる。本発明の炎症性サイトカイン産生抑制剤は、これらの疾患の予防や治療に利用することができる。

上記疾患の中でも以下に示すような疾患は、その病因が単に TNF- α だけに起因するものではないと考えられており、TNF- α 産生抑制剤の適応症としては考えにくい。すなわち、糖尿病、肝障害、自己免疫性脊髄炎、移植片対宿主病 (GVHD)、関節炎、甲状腺炎、橋本病、外分泌腺炎、細胞内感染症 (リューシュマニア、結核菌、ライ菌)、遅延型過敏症、あるいはペーチェット病等は、本発明による炎症性サイトカイン産生抑制剤に特有の新規適応疾患といえる。

更に、本発明の炎症性サイトカインの一つである IL-18 については、流産や早産との関連性が指摘されている。すなわち、IL-18 の産生を介した子宮頸部における炎症症状の進展が、子宮口の開大と子宮筋収縮につながると考えられてい

- 10 -

る。したがって、本発明の炎症性サイトカイン産生抑制剤は、IL-18 の産生抑制を通じて、流産や早産の治療や予防に有効である。

〔2〕 PARP の阻害剤

次に本発明は、前記式（1）で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドン、すなわちピルフェニドンを主成分として含有する、ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼ (poly-ADP-ribose-polymerase、以下 PARP と省略する) の阻害剤に関する。

PARP は、傷害を受けた DNA 鎮近傍の蛋白（ヒストン、PARP 自身など）をポリ-ADP-リボシル化する反応を触媒する酵素である。この酵素活性は切断された DNA に依存し、アポトーシス時にカスパーゼ 3 の切断（116KD から 85KD へ）を受けて活性化されるという性質を有する。PARP の基質は、NAD とポリ-ADP-リボシル化のための受容体側の蛋白である。この酵素の役割としては、ポリ-ADP-リボシル化によって大量の細胞内 NAD を消費することも重要視されている。すなわち、細胞や組織の NAD と ATP を急激に減少させることによって細胞や組織のアポトーシスやネクローシスを促進すると考えられている(Ha, H. C. and Snyder, S. H. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 96, No. 24, 13978-13982, 1999)。したがって、PARP の酵素阻害によって、関節炎、I 型糖尿病、各種神経細胞死に由来する疾患（脳虚血・再灌流、アルツハイマー、パーキンソン病など）、レトロウイルス感染等の治療効果を期待できる。また本発明の PARP 阻害剤は、ネクローシスを伴う疾患の治療剤として有用である。中でも急激なアポトーシスが原因で起きるネクローシスに起因する疾患には、特に有効である。このような疾患としては、急性肝炎を挙げることができる。すなわち本発明は、ピルフェニドンを主成分として含有する急性肝炎の治療剤に関する。

〔3〕 Jun-キナーゼおよび/または p38 MAP キナーゼ阻害剤

また本発明は、前記式（1）で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドン、すなわちピルフェニドンを主成分として含有する、Jun-キナ

- 11 -

ーゼおよび／または p38 MAP キナーゼ阻害剤に関する。

Jun-キナーゼ (JNK) と p38 MAP キナーゼ (MAPK) はアポトーシスの実行カスケードにおいて、非常に良く似た性質を有するものとされている (実験医学、17、No.2、1999、p96; 実験医学、14、No.19、1996、p27; Xia, Z. et al., Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, Science, 270:1326-1331, 1995)。いずれも、アポトーシスを誘導する刺激に対して活性化することが知られている。神経成長因子 (NGF) 処理により神経様に分化した PC 12 細胞は、培地から NGF を除去することによりアポトーシスを起こす。このときアポトーシスに先立って JNK、p38 の活性化が認められた。また、このアポトーシスは dominant negative 型 SEK1/MKK4 あるいは dominant negative 型 MKK3 を発現することにより抑制された。さらにこの PC12 細胞に MEKK1 または MKK3 の活性型と p38 を発現させるとアポトーシスが誘導された。このことから JNK および p38 が NGF 除去によるアポトーシスに必要十分であることが明らかになった (医学のあゆみ Vol.187 No.5, 1998, 10.31. p348-353)。また、他のストレス刺激、DNA 傷害やセラミド、紫外線、γ線、IgM、anoikis などでも両経路の関与が示唆されている。

JNK は、酸化、紫外線、放射線、虚血再灌流、DNA 損傷、浸透圧刺激、熱、蛋白合成阻害、重金属、亜砒酸塩、炎症性サイトカインなどの種々のストレスで上昇することが知られている。したがって、本発明の JNK および／または p38 MAP K 阻害剤は、これらストレスが病態の進行と形成に関与するとされるすべての疾患に対する治療や予防に有効である。具体的な原因として、発熱、外傷、肥大、細菌感染 (マイコバクテリア)、DNA ウィルス感染、酸化ストレス、炎症、虚血、グルコース飢餓、などによって引き起こされる疾患の治療や予防に対して有効である。

特に JNK には、細胞のアポトーシスのシグナル伝達経路との関連が示唆されている。その観点からは、たとえば次のような疾患に対する予防や治療効果を期

- 1 2 -

待することができる。すなわち、肥大型心筋症、虚血・再灌流、心筋梗塞、放射線傷害、あるいは抗癌剤による副作用等を挙げることができる。

また、この JNK の基質である c-jun は c-fos とともにリン酸化されると AP-1 を形成し、この転写因子が種々の増殖因子のレセプターと会合して増殖因子系のシグナル伝達にも関与することが示されている。したがって、JNK の阻害によって細胞の過増殖に由来する疾病の治療や予防を達成することができる。

なお、p38 MAPK 特異的阻害剤や p38 経路に属するカスケード下流の基質酵素のノックアウトマウスを用いた解析が既に行われている。その結果によると、p38 MAPK の阻害によって IL-12 や IFN- γ の產生が抑制されることが示されている (Lu. HT et al., Defective IL-12 production in mitogen-activated protein(MAP)kinase kinase3 (MKK3)-deficient mice, EMBO J., 1999, 18(7): 1845-57; Rincon-M. et al., Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway, EMBO J., 1998, 17(10): 2817-29)。したがって、前記炎症性サイトカインのうち IL-12 や IFN- γ については、p38 MAPK に対する阻害作用の結果である可能性も否定できない。

〔4〕アポトーシスの阻害剤

更に本発明は、前記式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドン、すなわちピルフェニドンを主成分として含有する、アポトーシスの阻害剤を提供する。ピルフェニドンが、実施例に示すように、アポトーシス阻害作用を持つことは新規な知見である。特に LPS 腹腔投与によって人為的に引き起こされた急性肝炎症状において、LPS 投与後のピルフェニドン投与が治療的効果を示すことに注目すべきである。公知の抗アポトーシス活性化合物の多くは、アポトーシスを生じる前に予防的に投与しておかなければ十分なアポトーシス阻害効果を期待できない。すなわち、予防剤としては有効であっても治療剤としての有効性は期待できないものであった。これに対して本発明によるアポト

- 1 3 -

シス阻害剤は、進行しつつあるアポトーシスを阻害することができる。すなわち、治療的な効果を期待することができる。アポトーシスに対してこのような作用機構を持つピルフェニドンは、たとえば、急性肝炎で起こる肝臓の内出血性壞死（急激な病的アポトーシスを伴う）や、移植後慢性拒絶などに対する予防剤であるとともに、治療剤として発症後の投与に適する。したがって本発明のアポトーシス阻害剤は、進行しつつあるアポトーシスを治療することを目的として用いる医薬に関する。

アポトーシスが関与するそれ以外の適応疾患としては、例えば、糸球体腎炎、急性肺傷害、間質性肺炎、心肥大、心筋症、網膜剥離、自己免疫疾患、心筋梗塞虚血、糖尿病、炎症性腸疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、全身性エリテマトーデス、乾せん、AIDS、汎血球減少症、不応性貧血、再生不良性貧血、ウイルス性肝炎、劇症肝炎、肝硬変、脳虚血、脳梗塞、シェーグレン症候群、唾液腺炎、激症型骨髓腫、動脈硬化、ペーチェット病、多発性硬化症、縁内障、白内障、パーキンソン病、アルツハイマー、筋萎縮性側索硬化症、放射線傷害、敗血症などが挙げられる。

ピルフェニドンが、アポトーシス関連因子である、IL-12、IL-18、IFN- γ 、PARP、JNK、あるいはp38 MAPKの阻害に有効であることは既に述べた。これらのアポトーシス関連因子は、いずれも以下に述べるような機構に基づいてアポトーシスに密接に関連することから、ピルフェニドンは、アポトーシスの阻害剤として有用である。

1) IL-12/IL-18/IFN- γ 產生抑制と抗アポトーシス

実施例において *in vivo* LPS投与マウスの実験で示されている通り、ピルフェニドンによる上記炎症性サイトカインの产生抑制は Fas、FasL の产生を抑えることに繋がると考えられる。その結果として、肝細胞のアポトーシスが効果的に抑制される。

2) 抗PARPと抗アポトーシス

- 14 -

一般にアポトーシスは、炎症を伴わないきれいな細胞死と言われている。ただし、LPS 腹腔投与による肝炎のような病的なアポトーシスの場合は、肝組織には急激なアポトーシスに伴って広汎にネクローシスを生じることが報告されている。この現象は、実施例における病理所見でも観察されている。その原因のひとつとして考えられているのが、組織における NAD の急激な減少である。アポトーシスを起こした細胞では PARP による ADP-リボシル化反応が急速に進み NAD を大量に消費することは先に述べた。したがって、急激なアポトーシスは、組織における NAD の大量消費を伴う。ネクローシスは、NAD の減少に伴って組織内の ATP が減少し、組織の代謝回転が不全状態に陥ることによってもたらされると説明することができる(Ha, H. C. and Snyder, S. H. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol.96, No.24, 13978-13982, 1999)。

さて、実施例に示すように、ピルフェニドンは、LPS 腹腔投与による肝炎症状におけるネクローシスを確実に抑制する。この作用は、ピルフェニドンが PARP 活性の阻害を通じてネクローシスの原因となる NAD の消費を抑制した結果であると考えられる。したがって、ピルフェニドンは、PARP 阻害作用を通じて、急性肝炎で起こる肝臓の内出血性壊死（急激な病的アポトーシスを伴う）の抑制に薬効的に貢献するものといえる。

3) JNK 阻害、p38 MAPK 阻害と抗アポトーシス

JNK と p38 MAPK は、いずれも細胞のアポトーシスを誘導するような刺激に対して活性化することは既に述べた。したがって、これらのキナーゼの阻害作用を持つ化合物はアポトーシス阻害剤として有効である。

更に JNK 阻害や p38 阻害が TNF- α 産生抑制を含めて抗炎症作用と結びつくことは公知である。公知の JNK 阻害剤 (Swantek, J.L. et al., Mol. Cell. Biol., Vol.17, No.11, 6274-6282) や p38 阻害剤 (Young, P. et al., Agents Action s, 1993, 39, C67-C69; Prichett, W. et al., J. Inflamm., 1995, 45, 97-105) は、TNF- α の翻訳過程（生合成過程）に作用することによって TNF- α の産生

- 1 5 -

を抑制するといわれている。つまり、TNF- α の mRNA 産生や TNF- α の分泌には抑制作用を示さないとされている。ピルフェニドンもそのような特徴を有していることが本発明者らの解析から明らかになっているので、公知の JNK 阻害剤ならびに p38 MAPK 阻害剤と同様の機構によって TNF- α の産生を抑制する。したがって、先に報告されているピルフェニドンによる TNF- α 産生抑制作用（特表平 11-512699）は、JNK 阻害ならびに p38 MAPK 阻害の結果としてもたらされた現象と考えられる。

以上に述べたように、ピルフェニドンのアポトーシス阻害作用の作用点を明らかにしたところに、本発明の大きな意義がある。アポトーシスは、物理的な作用をはじめとするさまざまな機構によって開始する複雑なシステムである。したがって、同じアポトーシスによってもたらされる疾患であっても、その原因は多様であることは言うまでも無い。そのため、ある疾患に有効であるアポトーシス阻害剤が、他のアポトーシス原因疾患に対しても同様の効果を示すとは限らない。アポトーシス阻害剤を有効に治療や予防に生かすには、その作用点を明らかにした上で、治療すべきアポトーシスの原因に対して有効なアポトーシス阻害剤を選択するのが合理的である。このような理由により、ピルフェニドンの阻害作用がどのアポトーシス関連因子に作用しているのかを見出した本発明の有用性は明らかである。

「アポトーシス阻害剤」は、以下に示す疾患を含む、アポトーシスを起因とする疾患の治療または予防に有効である。従って、これらの疾患のための治療剤、または予防剤として利用することができる。

劇症肝炎、C型及びB型ウイルス性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、続発性肝硬変
糸球体腎炎、尿細管・間質性腎炎、巣状糸球体硬化症、腎硬化症、腹膜硬化症、
ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症

急性肺傷害、間質性肺炎、放射線肺障害

急性および慢性の移植片対宿主病(GVHD)、手術後瘻着

- 1 6 -

拡張性心筋症、PTCA 後の再狭窄

潰瘍性大腸炎、クローン病

後天性免疫不全症候群(AIDS)

慢性関節リウマチ

全身性エリテマトーデス、ペーチェット病、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、サルコイドーシス、重症筋無力症、筋萎縮性側索硬化症、筋ジストロフィー、SLE
パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、ハンチントン病

再生不良性貧血、敗血症

熱症、ケロイド・肥厚性瘢痕、乾癬

網膜剥離

特に、本発明では、標的因子を明らかにしたことによって、次のような疾患を新たに適応症として挙げることができる。すなわち、肝炎(劇症、慢性、アルコール性、C型及びB型ウイルス性肝炎も含む)、毒物性あるいは代謝性肝障害、ペーチェット病、再生不良性貧血、AIDS、汎血球減少症、不応性貧血、脳梗塞、緑内障、白内障、唾液腺炎、放射性障害、紫外線傷害、日光皮膚炎、多形紅斑、固定葉疹、GVHD、TEN、偏平疣贅、単純ヘルペス、エリテマトーデス、苔癬化組織反応、尿細管傷害、呼吸器感染症、糖尿病、動脈硬化症、脳虚血、心筋梗塞、拡張型および肥大型心筋症、円形脱毛症、あるいは薬剤性脱毛症は、本発明において明らかにされた抗アポトーシス剤の新たな適応症である。中でも、劇症肝炎と続発性肝硬変については、本発明のアポトーシス阻害剤の投与によって発症後の治療が可能なことから、公知の薬剤では期待できない高度な治療効果を達成するものである。

本発明の炎症性サイトカイン産生抑制剤、PARP の阻害剤、JNK および/または p38 MAPK 阻害剤、あるいはアポトーシスの阻害剤を、上記の疾患の治療あるいは予防を目的としてヒトに投与する場合は、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、丸剤、液剤等として経口的に、または注射剤、坐剤、経皮吸収剤、吸入剤等とし

- 1 7 -

て非経口的に投与することができる。また、軟膏剤およびクリーム製剤として外用に用いることができる。本化合物の有効量にその剤型に適した賦形剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、滑沢剤等の医薬用添加剤を必要に応じて混合し、医薬製剤とすることができる。注射剤の場合には、適当な担体と共に滅菌処理を行って製剤とする。投与量は疾患の状態、投与ルート、患者の年齢、または体重によっても異なり、最終的には医師の判断に委ねられるが、成人に経口で投与する場合、通常10~40 mg/kg/日を投与することができる。これを1回あるいは数回に分割して投与すればよい。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

図1は、TNF- α 、IL-12、およびIFN- γ 産生に対するピルフェニドンの抑制効果を示す図である。

図2は、LPSショックモデルマウスの生存に及ぼすピルフェニドンの前処理の効果を示す図である。

図3は、LPSショックモデルマウスの生存に及ぼすピルフェニドンの治療効果を示す図である。

図4は、LPSショックモデルマウスの生存に及ぼすピルフェニドンの治療効果を示す図である。

図5は、抗Fas抗体投与マウス劇症肝炎モデルにおける血漿GOT、GPT値に対するピルフェニドンの抑制効果を示す図である。

図6は、THP-1細胞からのTNF- α 産生のピルフェニドンによる抑制効果を示す図である。

図7は、NK3.3細胞からのIFN- γ 産生のピルフェニドンによる抑制効果を示す図である。

- 1 8 -

図 8 は、LPS ショックモデルマウスの TNF- α 產生に及ぼすピルフェニドンの抑制効果を示す図である。

図 9 は、LPS ショックモデルマウスの IL-18 產生に及ぼすピルフェニドンの抑制効果を示す図である。

図 10 は、LPS 投与 6 時間後の肝臓を示す写真である。

図 11 は、LPS 投与の肝臓の経時変化を示す写真である。

図 12 は、LPS ショックモデルマウスの肝臓の鬱血性壞死に対するピルフェニドン投与の効果を示す写真である。

図 13 は、LPS ショックモデルマウスの肝臓におけるピルフェニドン投与の効果を調べた組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色像を示す写真である。A : LPS 非接種の対照、B : LPS 接種マウス。

図 14 は、LPS ショックモデルマウスの肝臓におけるピルフェニドン投与の効果を調べた組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色像を示す写真である。A : LPS 接種の 5 分前にピルフェニドンを投与、B : LPS 接種の 4 時間後ピルフェニドンを投与。

図 15 は、LPS ショックモデルマウスの肝臓におけるピルフェニドン投与の効果を調べた組織切片の Tunel 染色像を示す写真である。A、B は図 13 と同様である。

図 16 は、LPS ショックモデルマウスの肝臓におけるピルフェニドン投与の効果を調べた組織切片の Tunel 染色像を示す写真である。A、B は図 14 と同様である。

図 17 は、LPS ショックモデルマウスの肝臓におけるピルフェニドン投与の効果を調べた組織切片の ssDNA 染色像を示す写真である。A、B は図 13 と同様である。

図 18 は、LPS ショックモデルマウスの肝臓におけるピルフェニドン投与の効果を調べた組織切片の ssDNA 染色像を示す写真である。A、B は図 14 と同様である。

- 1 9 -

ある。

図19は、LPSショックモデルマウスの肝臓におけるピルフェニドン投与の効果を調べた組織切片のPCNA染色像を示す写真である。A、Bは図13と同様である。

図20は、LPSショックモデルマウスの肝臓におけるピルフェニドン投与の効果を調べた組織切片のPCNA染色像を示す写真である。A、Bは図14と同様である。

図21は、LPS投与マウスの炎症性サイトカイン産生と肝臓のアポトーシスによるDNAラダー形成を示す図および写真である。

図22は、LPSショックモデルマウスの炎症性サイトカイン産生と肝臓のアポトーシスに及ぼすピルフェニドンの前処理の効果を示す図および写真である。

図23は、LPSショックモデルマウスの炎症性サイトカイン産生と肝臓のアポトーシスに及ぼすピルフェニドンの後処理の効果を示す図および写真である。

図24は、LPSショックモデルマウスのDNAラダー形成、ポリ-ADP-リボシル化、およびNAD量の経時変化を示す図および写真である。

図25は、LPSショックモデルマウスのDNAラダー形成、ポリ-ADP-リボシル化、およびNAD量に対するピルフェニドンの投与効果を示す図および写真である。

図26は、エトポシドによって誘導したTHP-1のアポトーシスに対するピルフェニドンの効果を示す図および写真である。縦軸は細胞数（小体数）（サイドスキャッター）、横軸は細胞（小体）の大きさ（フォワードスキャッターによる）を表わしている。

図27は、エトポシドによってTHP-1のアポトーシスを誘導したTHP-1のバイアビリティーに対するピルフェニドンの効果を示す図である。

図28は、エトポシドでアポトーシスを誘導したTHP-1細胞のDNAラダー、ポリ-ADP-リボシル化、およびNAD量の経時変化を示す図および写真である。

- 2 0 -

図29は、エトボシドでアポトーシスを誘導した THP-1 細胞の DNA ラダー、ポリ-ADP-リポシル化、および NAD 量の経時変化に対するピルフェニドンの抑制効果を示す図および写真である。

図30は、エトボシドによるアポトーシスに伴って上昇した THP-1 の、細胞内カスパーゼ-3 活性に対するピルフェニドンの抑制効果を示す図である。縦軸は蛍光強度を表す。

図31は、LPS 刺激した RAW264.7 細胞における細胞内・外の TNF- α 産生および TNF- α mRNA の発現に対するピルフェニドンの効果を示す図および写真である。

図32は、ピルフェニドンの JNK に対する作用を示す図である。

図33は、ピルフェニドンの p38 MAPK に対する作用を示す図である。

図34は、ピルフェニドンの PARP に対する作用を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例および参考例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[実施例 1] TNF- α 、IL-12、および IFN- γ 産生に対するピルフェニドンの抑制効果

マウス急性炎症モデル（主に LPS 投与マウス）を用い、ピルフェニドンの効果を主に炎症性サイトカインの抑制とマウスのショック死に対する防御活性から評価した。まず、TNF- α 、IL-12、および IFN- γ 産生に対するピルフェニドンの抑制効果を調べた。マウス（C57BL/6、8 週齢雌）（n=4）を用い、LPS 接種の 5 分前にピルフェニドンまたは担体（0.5% CMC）のみを投与した。LPS (50 μ g/kg) + D-gal (250mg/kg) を腹腔内投与し、TNF に関しては 75 分後、IL-12 および INF に関しては 5 時間後にマウスを屠殺し、血清を回収した。血清中の TNF、IL-12、および IFN- γ を ELISA によりアッセイした。その結果、ピルフェニドン

- 2 1 -

は *in vivo* マウスの LPS ショックにおいて血清中に出現する一連の炎症性サイトカイン、TNF- α 、IL-12、および IFN- γ の産生を用量依存的に抑制することが判明した（図 1）。

【実施例 2】 LPS ショックモデルマウスの生存に及ぼすピルフェニドンの予防効果

LPS ショックモデルマウスの生存に及ぼすピルフェニドンの前処理の効果を調べた。マウス（C57BL/6、8 週齢雌）（n=8）を用い、LPS 注射の 5 分前に担体またはピルフェニドン（200 μ l p.o.）を投与した。LPS（*E. coli*, 50 μ g/kg）+ D-gal（250mg/kg）を腹腔内投与し、経時的に生き残ったマウスを計数した。その結果、ピルフェニドンは、LPS によるショック死に対し予防効果を発揮することが判明した（図 2）。

【実施例 3】 LPS ショックモデルマウスの生存に及ぼすピルフェニドンの治療効果

LPS ショックモデルマウスの生存に及ぼすピルフェニドンの LPS 接種後投与の効果を調べた。

マウス（C57BL/6、7 週齢雌）（n=6）を用い、実施例 2 と同様に LPS [（*E. coli*, 10 μ g/kg）+D-gal（250mg/kg）] を腹腔内投与した後、図に示した時間に担体またはピルフェニドン 500mg/kg（200 μ l p.o.）を投与した。その後、経時的に生き残ったマウスを計数した。その結果、LPS 接種の 5 時間後においても、ピルフェニドン投与による治療効果が得られることが判明した（図 3）。

マウス（C57BL/6、11 週齢雌）（n=5）を用い、LPS [（*E. coli*, 50 μ g/kg）+D-gal（250mg/kg）] をマウスに腹腔内投与した後、図に示した時間に担体（0.5% CMC）またはピルフェニドン 500mg/kg（200 μ l p.o.）を投与した。その後、経時的に生き残ったマウスを計数した。上記の結果と同様、LPS 接種の 5 時間後においても、ピルフェニドン投与による治療効果が得られることが判明した（図 4）。

- 2 2 -

【実施例 4】 マウス劇症肝炎モデルにおけるピルフェニドンの肝機能低下の防止効果

抗 Fas 抗体投与マウス劇症肝炎モデルにおける血漿 GOT、GPT 値に対するピルフェニドン投与の影響を調べた。マウス (BALB/C、10 週齢雄) (n=6 または 5) を用い、担体 (0.5% CMC) またはピルフェニドンを投与した。その直後に抗 Fas mAb (Jo2, 100 μ g/kg i.v.) を注射した。24 時間後、マウスを屠殺し、血漿と肝臓を回収した。血漿 GOT および GPT 値をそれぞれ GOT-UV Test Wako および GPT-UV Test Wako を用いてアッセイした。その結果、ピルフェニドン投与マウスでは、肝破壊マーカーである血漿 GOT および GPT 値の増加が抑制されることが判明した (図 5)。さらに、ピルフェニドン投与マウスでは、組織レベルでも肝細胞のアポトーシスによる組織破壊が抑制されていた。

実施例 1 ~ 4 に示した LPS 投与マウスと抗 Fas 抗体投与マウスの系における結果から、ピルフェニドンは LPS 投与マウスの血中炎症性サイトカイン産生を抑制するのみならず、肝細胞アポトーシスを伴った肝臓組織障害を直接防御することによってショック死を抑制していることが示唆される。

【実施例 5】 *in vitro* サイトカイン産生系によるピルフェニドンの効果

ヒト由来のモノサイト THP-1 細胞 (5×10^5 / ml) を LPS (10 μ g/ml) の存在下または非存在下、図示した濃度のピルフェニドンと共に 3 時間インキュベートした。インキュベーション後、培養上清中の TNF- α を ELISA により定量した。その結果、ピルフェニドンは、THP-1 細胞における TNF- α 産生を用量依存的に抑制した (図 6)。IC₅₀ は 45 μ g/ml と計算された。

ヒト由来 NK 細胞 (NK3.3) (5×10^5 / ウエル) (96 ウエルプレート、全量 200 μ l) を、IL-12 (10ng/ml) の存在下または非存在下、10% FCS および 5% ヒト血清、図示した濃度のピルフェニドンを含む AIM-V medium で 37°C で 48 時間インキュベートした。インキュベーション後、培養上清中のヒトイントフェロン γ (IFN- γ) を ELISA (Quantikine) により定量した。その結果、ピルフェニド

- 2 3 -

ンは、NK3.3 細胞における IFN- γ 産生を用量依存的に抑制した（図 7）。IC₅₀ は 51 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と計算された。

THP-1 細胞 ($1 \times 10^6 / \text{ml}$) を LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の存在下または非存在下、0, 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のピルフェニドンと共に 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、培養上清中の TGF- β を ELISA により定量した。同様に、THP-1 細胞 ($1 \times 10^6 / \text{ml}$) を LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の存在下または非存在下、0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のピルフェニドンと共に 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、培養上清中の PDGF-AB を ELISA により定量した。その結果、ピルフェニドンは、THP-1 細胞における TGF- β および PDGF-AB 産生を用量依存的に抑制した。TGF- β および PDGF-AB の産生抑制における IC₅₀ は、それぞれ 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と計算された。

マクロファージ細胞株 P388.D1 を LPS の存在下または非存在下、さまざまな濃度のピルフェニドンと共にインキュベートした。インキュベーション後、培養上清中の TNF- α または IL-6 を ELISA により定量した。その結果、ピルフェニドンは、P388.D1 細胞における TNF- α 産生を用量依存的に抑制した (IC₅₀ は 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と計算された)。しかし、IL-6 の産生は抑制しなかった。

[実施例 6] LPS ショックモデルマウスの生存に及ぼすピルフェニドンの前処理の効果

LPS ショックモデルマウスの生存に及ぼすピルフェニドンの前処理の効果を時間を変えて調べた。マウス (C57BL/6、7 週齢雌) (n=5) を用い、LPS 注射より 24 時間前、3 時間前、および 30 分前に担体またはピルフェニドン 500mg/kg (200 μl p.o.) を投与した。LPS (*E. coli*, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) +D-gal (250mg/kg) を腹腔内投与し、経時的に生き残ったマウスを計数した。その結果、ピルフェニドンは、LPS 接種の 3 時間以上前に投与しても、ショック死に対し予防効果を発揮することが判明した。

[実施例 7] LPS ショックモデルマウスの TNF- α 産生に及ぼすピルフェニド

- 2 4 -

ンの抑制効果

LPS ショックモデルマウス (*P. acnes* 死菌感作) の血中 TNF- α 產生に及ぼすピルフェニドンの抑制効果を調べた。マウス (C57BL/6、15 週齢雌) (n=5) に、熱失活させた *P. acnes* を 2mg/マウスで腹腔内投与した。10 日後、担体 (0.5% CMC) またはピルフェニドン 500mg/kg (200 μ l p.o.) を投与し、5 分後に LPS 接種 (100 μ g/kg) を行った。LPS 接種の 1.5 時間後に屠殺して血清を回収した。血清中の TNF- α を ELISA によりアッセイした。その結果、ピルフェニドンは、LPS 接種マウスの TNF- α 產生を *in vivo* で抑制することが判明した (図 8)。

[実施例 8] LPS ショックモデルマウスの IL-18 產生に及ぼすピルフェニドンの抑制効果

LPS ショックモデルマウス (*P. acnes* 死菌感作) の血中 IL-18 產生に及ぼすピルフェニドンの抑制効果を調べた。マウス (C57BL/6、15 週齢雌) (n=5) に、熱失活させた *P. acnes* を 2mg/マウスで腹腔内投与した。10 日後、担体 (0.5% CMC) またはピルフェニドン 500mg/kg (200 μ l p.o.) を投与し、5 分後に LPS 接種 (100 μ g/kg) を行った。LPS 接種の 1.5 時間後に屠殺して血清を回収した。血清中の IL-18 を ELISA によりアッセイした。その結果、ピルフェニドンは、LPS 接種マウスの IL-18 產生を *in vivo* で抑制することが判明した (図 9)。

[実施例 9] LPS 投与マウスの肝臓の鬱血性壞死とピルフェニドン投与の効果

マウス (C57BL/6 10 週齢雌) に LPS ((*E. coli*, 50 μ g/kg) + D-gal (250 mg/kg)) を投与し、6 時間後の肝臓の肉眼所見を図 10 に示す。肝臓の肥大と著しい鬱血が観察される。また、LPS 投与後の肝臓の経時変化を図 11 に示す。

LPS 投与後の肝臓の鬱血性壞死に対するピルフェニドンの効果を、LPS 投与 6 時間後の肝臓の肉眼所見を観察した。ピルフェニドンの投与は、LPS 投与の 5 分前または 4 時間後に行った。その結果を図 12 に示す。ピルフェニドンの前投与および後投与両者において、病変の緩和が認められた。

更に、LPS 接種マウス肝およびピルフェニドン投与マウス肝の病理組織学検査

- 2 5 -

を行った。マウス (C57BL/6、雌、約 8 週) を用い、健常マウス (対照) (ピーカル (0.5%CMC) 投与) および LPS 投与マウス ($50\mu\text{g}/\text{kg}$ + D-galactosamine $250\text{ mg}/\text{kg}$, i.p. (Volume $200\mu\text{l}$)) から、投与後 5.5 時間後に肝を切り出した (外側左葉 (3 個所断続切片) (3 頭各 3 個、計 9 個))。組織切片を作製後、ヘマトキシリン・エオシン (H.E.) 染色、Tunel 法、PCNA 法、あるいは ssDNA 法による染色を行った。Tunel 法は、オンコア社、アポプ・タグ *in situ* アポトーシス検出キットペルオキシダーゼ (カタログ No. S7100-KIT) を用いて添付のプロトコールに従って行なった。ssDNA 法には、抗 Single Stranded DNA (ssDNA) A) ウサギポリクローナル抗体 (DAKO 社製品コード A4506) を 1 次抗体として使用し、検出は DAKO 社 LSAB2 キット/HRP-ユニバーサル (カタログ No. K0677) を添付のプロトコールに従って使用した。

PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) は、細胞周期 G1 期から S 期にかけて最大限に合成される分子量 36KD の核タンパクである。本法においては PCNA 抗体 (DAKO 社、カタログ No. M879) を 1 次抗体として用い、検出は DAKO 社 LSAB2 キット/HRP-ユニバーサル (カタログ No. K0677) を添付のプロトコールに従って使用した。

組織所見から、健常マウスの肝組織は、図 1 3A に示す様に、全く異常は見られなかった。Tunel 法の切片においても全く異常は見出されなかった (図 1 5 A)。PCNA 法においてのみ少数の肝細胞に陽性細胞が見られた。二核の肝細胞でも陰性のものも多く、また单核のものでも陽性のものが見られた。しかし切片全体としては極く少数個である。これらの所見は、正常の肝細胞の再生像 (核分裂) である。

これに対し、LPS 投与マウス (ピーカル投与群) の肝組織では、表 1 の通りほとんどの項目が陽性で、特に核の変化が著しかった (+～+～++)。Tunel 法と ssDNA 法ではほぼ同程度陽性の細胞が認められた。更に核壁濃染した核内にも陽性所見が見られ、また細胞質内にも微少球状顆粒が少量見られる細胞も

- 2 6 -

あった。PCNA 法でも少数の核内に陽性物質を認めたが、Tunel 法または ssDNA 法とは全く異なる染色像で、陽性細胞は対照の健常マウス群よりやや多い程度であった。ただし、ピークル投与群では正常核がほとんど見られないので、変形した核や、類壞死した核内に多く認められた。すなわち、「アポトーシス」と「核蛋白の合成」は同一肝細胞内では起らないものようである。この他 LPS 投与群で一番目立つ所見が出血で、殆ど全葉に大小の出血斑が見られた。この出血に伴って、肝細胞核の変化—濃縮、崩壊、核壁濃染等が各所に認められた。更にこの核の消失、即ち細胞壞死が起こり、これが所謂「好酸体」として見出された(図 13B)。Tunel 法においても、各所に陽性核が見出されたことは、H.E.染色で一見正常に見られる肝細胞でも、アポトーシスによって変性が始まっているものと推定される(図 15B)。

上記 LPS 接種マウスに、接種の 5 分前、および接種の 4 時間後にピルフェニドン(500 mg/kg) (またはピークル) を経口で投与し、組織所見に及ぼす効果を検証した。ピルフェニドン投与した LPS マウスにおいては、基本的所見は健常マウスと殆ど同じで異常は全く見られなかった。健常マウスよりも、小細胞集簇がやや多いこと、Tunel 法および ssDNA 法で、非特異的陽性核が、切片の周辺部や、門脈内面の核により多く認められた(図 16、図 18 および図 20)。また、極く少数の単細胞壞死を示す好酸体が見出され、その他、Tunel 法、ssDNA 法で僅かにやっと見出せる程度に陽性細胞が見出された。PCNA 法では健常マウス群と同程度の陽性細胞が観察された。

以上をまとめると、LPS 投与により、マウスの肝に、点状一斑状出血と、これに伴う広範囲の肝細胞の変性、壞死を認めたが、ピルフェニドン投与により、これらの諸病変は、殆ど完全に防御され、健常マウスの肝と同様な所見となった。また、Tunel 法および ssDNA 法により、LPS 投与肝において、多数のアポトーシス陽性肝細胞を認めたが、薬剤投与マウスにおいては、陽性肝細胞はほとんど認められないことが判明した。病理組織学的所見を表 1 に示す。

- 27 -

表 1

被検臓器	肝臓	i: Tunel j: ssDNA k: PCNA													
染色方法	HE														
病理所見	a 出血 b 斑状壊死 c 単細胞壊死	d 核濃縮 e 核崩壊 f 核壁濃染 g 核分裂 h 細胞集簇													
	a b c	d e f g h	i	j	k										
健常マウス	- - -	- - -	-	-	-	-	-	-	+	-	-				
LPS投与マウス	++ + ++	++ ++ ++	-	-	-	++	++	++	++	++	++				
ピルフェニドン 投与マウス (LPS投与5分前)	- -	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+				
ピルフェニドン 投与マウス (LPS投与4時間後)	- -	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+				
注) 1. [病変の程度] - : 所見ない ± : 極軽度 + : 軽度 ++ : 中等度 +++ : 高度															

[実施例 10] LPS 投与マウスの炎症性サイトカイン産生と肝臓のアポトーシス
LPS 投与マウスの炎症性サイトカイン産生と肝臓のアポトーシスによる DNA ラ

- 2 8 -

ダー形成を調べた。マウス (C57BL/6 10 週齢雌) に LPS (*E. coli*, 50 μ g/kg) +D-gal (250mg/kg) を腹腔内投与し、経時的に血中の炎症性サイトカインを ELISA により定量した。TNF- α 、IL-12、IFN- γ の產生誘導が観察された (図 2 1 上)。LPS 投与後のマウスの肝臓からゲノム DNA を調製し、DNA ラダー形成を測定した。DNA ラダー形成は、ワコーの Apoptosis Ladder Detection Kit Wako に従って検出した。その結果、LPS 投与後 5 時間以降に顕著な DNA ラダー形成が観察された (図 2 1 下)。

LPS ショックモデルマウスの炎症性サイトカイン產生と肝臓のアポトーシスに及ぼすピルフェニドンの前処理の効果を調べた。マウス (C57BL/6 10 週齢雌) を用い、LPS 注射の 5 分前に担体またはピルフェニドン (500mg/kg p.o.) を投与した。LPS (*E. coli*, 50 μ g/kg) +D-gal (250mg/kg) を腹腔内投与し、経時的に炎症性サイトカイン產生と肝臓のアポトーシス (DNA ラダー形成) を測定した。その結果、ピルフェニドンは、LPS によるサイトカイン產生および DNA ラダー形成を劇的に抑制することが判明した (図 2 2)。

LPS 投与マウスの炎症性サイトカイン產生と肝臓のアポトーシスに対するピルフェニドンの後投与効果を調べた。マウス (C57BL/6 10 週齢雌) を用い、LPS [(*E. coli*, 50 μ g/kg) +D-gal (250mg/kg)] をマウスに腹腔内投与した 3 時間後に担体またはピルフェニドン 500mg/kg を投与 (p.o.) した。その後、経時的に炎症性サイトカイン產生と肝臓のアポトーシス (DNA ラダー形成) を測定した。その結果、ピルフェニドンは IFN- γ の產生誘導および DNA ラダー形成を抑制することが判明した (図 2 3)。この結果および実施例 9 の結果は、ピルフェニドンが、TNF- α の產生誘導とは別にアポトーシスおよびネクローシスに対する直接的な阻害作用を発揮することを示している。

[実施例 1 1] LPS 投与マウスの肝臓のアポトーシスおよび生化学変化

LPS で鬱血性壞死を誘導したマウス肝臓組織の DNA ラダー形成、ポリ-ADP-リボシリ化、および NAD 量の経時変化を調べた。マウス (C57BL/6 11 週齢雌) を

- 2 9 -

用い、LPS [(*E. coli*, 50 μ g/kg) +D-gal (250mg/kg)] をマウスに腹腔内投与し、2、3、4、5、および6時間後に肝臓のアポトーシス (DNA ラダー形成)、ポリ-ADP-リボシル化、およびNAD量を測定した。DNA ラダー形成は肝臓サンプルをワコーの Apoptosis Ladder Detection Kit Wako に従って検出した。ポリ-ADP-リボシル化は Anti-poly (ADP-Ribose) polyclonal antibody (rabbit, polyclonal)でウエスタンプロットにて検出した。NAD量は Nisselbaum の方法によって行なった (Nisselbaum, J.S., and S.Green. A simple ultramicro method for determination of pyridine nucleotides in tissues. *Anal. Biochem.* 27, 212-217 (1969))。その結果、LPS投与によりDNA ラダー形成、ポリ-ADP-リボシル化、およびNAD量の低下が誘導されることが判明した (図 24)。

LPSで鬱血性壊死を誘導したマウス肝臓組織のDNA ラダー形成、ポリ-ADP-リボシル化、およびNAD量に対するピルフェニドンの投与効果を、前投与および後投与において調べた。マウス (C57BL/6、10週齢雌) を用い、LPS [(*E. coli*, 50 μ g/kg) +D-gal (250mg/kg)] をマウスに腹腔内投与する5分前または4時間後に担体またはピルフェニドン 500mg/kg を投与 (p.o.) した (n=3)。LPS投与の6時間後に肝臓のアポトーシス (DNA ラダー形成)、ポリ-ADP-リボシル化、およびNAD量を、上記と同様にして測定した。その結果、ピルフェニドン投与により、DNA ラダー形成、ポリ-ADP-リボシル化、およびNAD量の低下が抑制されることが判明した (図 25)。これらの結果から、ピルフェニドンは、抗炎症作用と抗アポトーシス作用による組織障害に対する防御作用を有していると結論される。

[実施例 12] *in vitro* 培養系におけるピルフェニドンのアポトーシス阻害効果

ヒトモノサイト細胞株 THP-1 にエトボシドを添加してアポトーシスを誘導し、ピルフェニドン投与の効果を調べた。

6 ウエル培養プレートに THP-1 を 1.5×10^6 個 ($/2\text{ml}$) ずつまき、先にピル

- 3 0 -

フェニドン 10 mM を加えて（加えないものをコントロールとした）1 時間プレインキュベーションし、エトポシドを 100 μM 加えて（加えないものをコントロールとした）3 時間培養しアポトーシスを誘導し、アポトーシス小体の形成を写真撮影とセルソーター（Epix）で解析した。その結果、ビルフェニドンは、エトポシドによるアポトーシス小体の形成を有意に阻害することが明らかとなった（図 26）。

エトポシドによって THP-1 のアポトーシスを誘導し、処理後 6 時間の細胞のバイアビリティー（生存）に対するビルフェニドンの効果を WST-1（MTT アッセイと同様の原理によるアッセイ）で調べた。

THP-1 を $5 \times 10^5 / \text{ml}$ に調製して 96 ウエル培養プレートに 100 μl ずつまき、ビルフェニドン 1、3、10 mM（終濃度）加えたもの（加えないもの、コントロール）、エトポシド 100 μM（終濃度）加えたもの（加えないもの、コントロール）、各ウエルで調製して 6 時間培養し（total volume 200 μl）、6 時間後に下記の WST-1（Dojin Cell Counting kit）を 10 μl ずつ入れて更に 3 時間反応させて、細胞のバイアビリティーによって発色した培養上清を 100 μl ずつ別の 96 ウエルプレートに移し替え、450 nm で吸光度を測定した。その結果、ビルフェニドンはエトポシドによるアポトーシスを用量依存的に阻害することが判明した（図 27）。

【実施例 13】 *in vitro* 培養系におけるビルフェニドンの DNA ラダー形成および生化学変化に対する効果

エトポシドでアポトーシスを誘導した THP-1 細胞の DNA ラダー、ポリ-ADP-リボシル化、および NAD 量の経時変化を調べた。

THP-1 を $1 \times 10^6 / \text{ml}$ に調製して 24 ウエル培養プレートに 1 ml ずつまき、エトポシド 100 μM（終濃度）を加えて、0、1、2、3、4、5、および 6 時間後に順次細胞サスペンションを回収して 700 μl 分を DNA ラダー形成観察用に、300 μl 分を ADP-リボシル化観察用に分けた。700 μl 分から細胞をペレットダウンした後

- 3 1 -

ワコーの Apoptosis Ladder Detection Kit Wako のプロトコールに準じて DNA を抽出後、DNA を定量して濃度を合わせ、アガロースゲル電気泳動を行い、アポトーシスによる DNA ラダー形成の経時変化を観察した。ADP-リボシル化観察用の $300\mu\text{l}$ 分の細胞サスペンションはペレットダウンした後 SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解して 100°C 熱変性させた後 SDS-PAGE を行い、プロッティング用メンブレンにトランスファーして Anti-poly (ADP-Ribose) polyclonal antibody (rabbit, polyclonal) によってウエスタンプロットで検出した。また、NAD 量の経時変化は次のように検出した。THP-1 を $10^6/\text{ml}$ に調製して 24 ウエル培養プレートにまき、うち 5 ウエルは-エトポシド用、うち 5 ウエルは+エトポシド用とした。エトポシドを添加（終濃度 $100\mu\text{M}$ ）してから、0、1、2、4、および 6 時間後にそれぞれ細胞を回収し、前述の Nisselbaum の方法で NAD の定量を行って、細胞の NAD 量の経時変化を観察した。

その結果、DNA ラダー形成およびポリ-ADP-リボシル化は、エトポシド処理後 3 時間から検出された。また、エトポシド処理は NAD 値を有意に低下させた（図 28）。

次にエトポシドでアポトーシスを誘導した THP-1 細胞の DNA ラダー、ポリ-ADP-リボシル化、および NAD 量に対するピルフェニドンの抑制効果を調べた。

ピルフェニドンによる DNA ラダー形成抑制の観察は、THP-1 を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調製して 24 ウエル培養プレートに 1 ml ずつまき、エトポシド $100\mu\text{M}$ （終濃度）を加え、ピルフェニドン 10 mM 加えて 3 時間後に細胞を回収してペレットダウンした後、ワコーの Apoptosis Ladder Detection Kit Wako のプロトコールに準じて DNA を抽出後 DNA を定量して濃度を合わせ、アガロースゲル電気泳動を行い、アポトーシスによる DNA ラダー形成の抑制を観察した。ピルフェニドンによるカスパーゼ-3 活性化抑制の観察は、THP-1 を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調製して 6 ウエル培養プレートに 2 ml ずつまき、エトポシド $100\mu\text{M}$ （終濃度）を加えて、ピルフェニドン 10 mM 加えて 3 時間後に細胞を回収してペレットダウンした後、Phar

- 3 2 -

mingen 社の Caspase-3 Assay Kit のプロトコールに準じて細胞を Lysis させ、 Lysate 中の活性化されている Caspase-3 活性を蛍光基質を用いて測定した。ADP-リボシル化抑制の観察は、 THP-1 を $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調製して 24 ウエル培養プレートに 1 ml ずつまき、エトボシド $100 \mu\text{M}$ (終濃度) を加え、ピルフェニドン 10 mM 加えて 4 時間後に細胞を回収してペレットダウンした後 SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解して 100°C 熱変性させた後 SDS-PAGE を行い、プロッティング用メンブレンにトランスファーして Anti-poly (ADP-Ribose) polyclonal antibody (rabbit, polyclonal) によってウエスタンプロットで検出した。NAD 減少抑制の観察は、 THP-1 を $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調製して 24 ウエル培養プレートに 1 ml ずつまき、エトボシド $100 \mu\text{M}$ (終濃度) を加え、ピルフェニドン 10 mM 加えて 4 時間後に細胞を回収して前述の Nisselbaum の方法で NAD の定量を行った。

その結果、ピルフェニドンはエトボシドによる DNA ラダー形成、ポリ-ADP-リボシル化、NAD 量の低下、および Caspase-3 の活性化を有意に抑制することが判明した (図 29、図 30)。 *in vitro* 系におけるこれらの結果は、ピルフェニドンは、抗アポトーシス作用による直接的な細胞防御作用を有することを示している。ピルフェニドンは、サイトカイン産生抑制などの抗炎症作用により急性炎症を抑制すると共に、抗アポトーシス作用などによる細胞防御活性により組織障害 (アポトーシスやネクローシスなど) を抑制していることが示唆される。

カスパーゼ-3 はアポトーシスの実行過程に関与するプロテアーゼであり、その活性化 (アポトーシス時に 32kD のプロ体がプロセシングを受け 17kD の活性体になる) が細胞のアポトーシスの指標の一つとなっている。ピルフェニドンはこの酵素の活性を抑えていることから、ピルフェニドンはアポトーシス阻害作用を有することがわかる。本酵素に対するピルフェニドンの濃度依存性は他のパラメーター (DNA ラダー形成抑制、ポリ-ADP-リボシル化、NAD 低下抑制) などの抑制に対する濃度と一致していた。また、ウエスタンプロットによって 17kD の活性体の生成が同様な濃度に依存して抑制されていることも確認している。また、

- 3 3 -

活性化したカスパーゼ-3 を酵素源とし、Cell Free の酵素反応系としてピルフェニドンを加えてみたところ、ピルフェニドンはカスパーゼ-3 の活性自身には阻害作用を示さなかった。従って、ピルフェニドンはアポトーシスを阻害するが、カスパーゼ-3 はそのターゲット分子ではないことが考えられた。

[実施例 14] *in vitro* 細胞培養系における細胞内外の TNF- α 産生、および mRNA 発現に対するピルフェニドンの効果

RAW264.7 細胞における LPS 刺激時の細胞内・外 TNF- α 産生に対するピルフェニドンの抑制効果の検討を次のように行なった。RAW264.7 細胞を 6 穴プレートに 1 穴あたり 4×10^5 個/2 ml RPMI 1640 でまき、4 日間培養し Confluent とした。2 μ g/ml の LPS を含む 2 ml RPMI 1640 を各ウェルに添加し、ピルフェニドンはそのとき目的濃度の $\times 2$ で添加して 8 時間培養した。培養上清をとり、細胞外の TNF- α は ELISA で測定した。細胞内の TNF- α については次のように行なった。培養上清を回収した残りをペレットダウンし、細胞を 200 μ l の Lysis バッファー(下述)で細胞を溶解させ、細胞内に含まれる TNF- α を ELISA で測定した。

Lysis バッファーの組成は次の通りである。50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM MgCl₂、1 mM EGTA、10% Glycerol、1% Triton X-100、100 mM NaF、1 mM PMSF、10 mg/ml Aprotinin。使用した ELISA キットは、TNF- α : R&D mouse TNF- α immunoassay である。

TNF- α 産生の測定の結果、ピルフェニドンは RAW264.7 細胞内および上清中の TNF- α 産生を用量依存的に抑制することが判明した(図 31)。ピルフェニドンは、THP-1 細胞および P388.D1 細胞の LPS 刺激による培養上清(細胞外分泌)および細胞ライセート(細胞内)における TNF- α 産生を抑制することが明らかとなった。

また、ピルフェニドンによる TNF- α mRNA の発現変化を次のように検討した。RAW264.7 細胞を 10 cm 培養プレートにコンフルエント状態に培養し、Final 1 μ g/ml LPS、それぞれの濃度のピルフェニドンを添加して 4 時間培養した。培養

- 34 -

上清を除き、細胞から Qiagen RNeasy Mini Kit で Total RNA を精製し、2 μ g の RNA をホルムアミド変性させ、MOPS ゲルで電気泳動し、そのゲルを用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、ピルフェニドンは TNF- α mRNA 量を変化させなかった（図31下）。

次に、ピルフェニドンの TNF- α mRNA 安定性に対する影響を調べた。RAW264.7 細胞を 6 穴培養プレートにコンフルエントに培養し、Final 1 μ g/ml LPS、それぞれの濃度のピルフェニドン (300 μ g/ml) を添加して 4 時間培養後にアクチノマイシンD(シグマ)を Final 5 μ g/ml で添加し、それぞれ 0、1、3 時間後に Total RNA を精製して RT-PCR を行った。何も添加しない細胞、および LPS のみ添加した細胞を対照とした。逆転写酵素は、Gibco BRL SuperScript RT を用いた。PCR は、Taq ポリメラーゼに ExTaq を用い、1 μ M のプライマーにより、「95°C 1 min-55°C 1 min-72°C 1 min」を 29 サイクル行った。PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動した後、TNF- α mRNA に由来するバンドを検出して TNF- α mRNA の安定性を評価した。

何も添加しなかった細胞では、TNF- α に対応するバンドはほとんど検出されなかった。また、LPS のみ添加した細胞では、アクチノマイシンD 添加後 0 時間ににおいて TNF- α に対応する濃いバンドが検出され、その後徐々に減少した。LPS+ピルフェニドンを添加した細胞における TNF- α に対応する各バンドは、LPS のみ添加した細胞の場合と同様であった。この結果は、ピルフェニドンは TNF- α mRNA の分解を促進しないことを示している。このことから、ピルフェニドンは TNF- α の mRNA の安定性に影響を与えることによって（不安定性を促進することによって） TNF- α 産生を抑制しているのでもないことが明らかになった。これらのことより、ピルフェニドンは TNF- α の産生を分泌や転写レベルではなく、翻訳レベルで抑制していると結論される。

[実施例 15] Jun N-terminal Kinase (JNK) および p38 MAPK に対するピルフェニドンの効果

- 3 5 -

LPS による TNF- α の生合成シグナルとしては、c-Raf1 \rightarrow MKK1, 2 \rightarrow ERK1, 2 を経て TNF- α の転写誘導に至る経路と、LPS シグナルから MEKK1 \rightarrow MKK4 \rightarrow JNK(SAPK) および MKK3, 6 \rightarrow p38 を経て TNF- α の翻訳誘導に至る経路が知られている (Jenniferら, Mol. Cell. Biol. 17: 6274-6283, 1997)。上記のように、ビルフェニドンは TNF- α の産生を翻訳レベルで抑制していることが判明した。TNF- α 産生抑制の機構において翻訳レベルで産生を阻害するものの代表的なものとしては MAPK カスケードに関与する p38 MAPK (p38 MAPK) 阻害剤や c-Jun N-terminal kinase (JNK) の阻害などが知られている (Newton, R.C. and C.P. Decicco, Therapeutic potential and strategies for inhibiting tumor necrosis factor-alpha. Journal of Medicinal Chemistry., 1999, Vol.42, No.13, 2295-2314; Swantek, J.L. et al., Jun N-terminal kinase/stress-activated (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) translation: Glucocorticoids inhibit TNF- α translation by blocking JNK/SAPK. Molecular and Cellular Biology, Vol.17, No.11, 6274-6282)。そこで、次に MAPK カスケードに関与している ERK、JNK や p38 MAPK に対するビルフェニドンの作用を検討した。

まず、Cell free の酵素反応系で Jun N-terminal Kinase (JNK = Stress-Activated Protein Kinase; SAPK) の自己リン酸化と c-Jun のリン酸化を調べた。リン酸化の測定は、Stratagene c-Jun N-Terminal Kinase (内容物はキット化されている) を用いて添付のプロトコールに従って行った。

その結果、ビルフェニドンは JNK の c-Jun のリン酸化を濃度依存的に抑制した (図 3-2)。JNK は紫外線、酸化ストレス、虚血再灌流、損傷 DNA、浸透圧刺激、熱ストレス、蛋白質合成阻害、炎症性サイトカイン、アポトーシスなどの各種ストレス応答に関してその情報伝達系における重要性が示唆されている。上記の結果は、ビルフェニドンの活性の本体に JNK 阻害が含まれていることを示唆している。

- 3 6 -

次に、Cell free の酵素反応系で p38 MAPK に対する阻害作用を調べた。測定は、アップステートバイオテクノロジー社 p38:Upstate Biotechnology SAPK2 α /p38/RK Assay Kit を用いて添付のプロトコールに従って行なった。

その結果、ピルフェニドンは濃度依存的に *in vitro* cell free である p38 MAPK 酵素反応を阻害した（図 3 3）。RAW264.7 の LPS 刺激による TNF- α 産生抑制における有効濃度に比較して少し弱いが、活性の本体に p38 MAPK 阻害が少なくとも含まれていると考えられる。このことより、ピルフェニドンは MAPK カスケードのうち少なくとも p38 MAPK 経路を阻害することにより、各種ストレスや炎症の起炎時、アポトーシス誘導時などにおける本酵素群の活性を抑制することによって薬効を発揮していることが考えられる。ピルフェニドンの p38 MAPK 阻害および JNK 阻害の有効濃度はよく一致しており、両者の阻害がピルフェニドンの薬効の発揮に寄与していることが考えられる。

また、古典的 MAPK 経路の中心的なリン酸化酵素である ERK に対してアップステートバイオテクノロジー社のキット（ERK:Upstate Biotechnology MAPK1/Erk 1, MAPK2/Erk2 Sampler Pack.）をプロトコール通りに用い Cell Free の *in vitro* 酵素反応系で ERK1、ERK2 に対してピルフェニドンの抑制効果を検討してみたが、1000 μ g/ml の濃度まで全く阻害が認められなかった（データ省略）。これらのことより、ピルフェニドンは MAPK カスケードのうち JNK 経路と p38 MAPK 経路を阻害することにより、各種ストレスや炎症の起炎時、アポトーシス誘導時などにおける本酵素群の活性を抑制することによって薬効を発揮していることが考えられる。

[実施例 16] poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) に対するピルフェニドンの効果

PARP 活性の測定を、Trevigen Poly(ADP-ribose) Polymerase assay Kit. を用い、添付のプロトコールに従って行なった。

その結果、ピルフェニドンは PARP の酵素反応を濃度に依存して阻害しており、

- 3 7 -

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では約 45% 抑制することが判明した（図 3 4）。ADP-リボシル化はアポトーシスにおける NAD 減少と深く関わっており、PARP を阻害することがピルフェニドンの抗アポトーシス作用の本体の一部である可能性が考えられる。poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) は、傷害を受けた DNA 鎮近傍の蛋白（ヒストン、PARP 自身など）がこの酵素によってポリ-ADP-リボシル化を受ける反応を媒介する。PARP の酵素活性は切断された DNA に依存し、アポトーシス時にカスパーゼ-3 の切断(116Kd から 85KD へ)を受けて活性化されるという性質を有している。また、基質は NAD と受容体側の蛋白であり、ポリ-ADP-リボシル化に伴い大量の細胞内 NAD が消費されるというのが重要なポイントである。この反応の生理的意義については様々な説がある。PARP は、主に傷害を受けた DNA の修復に関わっており、細胞や組織における NAD や ATP の量を急激に減少させることによって、細胞や組織のアポトーシスやネクローシスを促進するとも考えられている。この酵素阻害を適用することが可能な具体的な疾患としては、関節炎、I 型糖尿病、神経細胞死に由来する疾患（脳虚血・再灌流、アルツハイマー、パーキンソン病など）、レトロウイルス感染などが挙げられる。

産業上の利用の可能性

本発明により、ピルフェニドンが持つ、次のアポトーシス関連因子の阻害作用が明らかにされた。

炎症性サイトカインの産生

ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼ

JNK および／または p38 MAPK

これらのアポトーシス関連因子は、いずれも相互に密接に関連しながらアポトーシス実行カスケードにおいて重要な位置を占める因子である。したがって、これらの因子を阻害することによって、アポトーシスを効果的に阻害することができる。アポトーシスは、疾患において様々な病態の原因となっていることが推定

- 3 . 8 -

されている。たとえば、劇症肝炎は肝細胞のアポトーシスが原因となっている。したがって、アポトーシス関連因子の阻害剤は、これらの病態の治療に有用である。

アポトーシスは、複雑な細胞制御機構の総合的な作用の結果として生じる現象である。一方、疾患の原因となるアポトーシスを誘導する原因は多様である。したがって、今後は、何がアポトーシスの原因となっているのかを見極め、原因に直接作用する薬剤を選択することによって、治療効果を高める努力が求められる。本発明のアポトーシス関連因子阻害剤は、その標的因子が明らかであることから、このような、標的因子を見極めた上での効果的な治療を可能とする。

本発明のアポトーシス関連因子阻害剤は、単にアポトーシスの阻害剤として有用なだけでなく、その標的因子を明らかにしたことにより、新たな有用性が期待される。すなわち、たとえば本発明における炎症性サイトカイン (IL-12、IL-18、および IFN- γ) は、アポトーシス関連因子であると同時に、様々な炎症症状においても重要な役割を果たしている。したがって、本発明の炎症性サイトカイン阻害剤は、これらのサイトカインが関与する炎症症状の緩和に利用することもできる。また、PARP は、例えば NAD を消費することによって組織の壊死を誘導する作用があることから、PARP の阻害剤はネクローシス阻害剤としての用途が考えられる。更に、JNK および／または p38 MAPK は、TNF- α 生合成への関与によって、炎症や免疫異常の原因となっている。したがって、その阻害剤は、抗炎症剤、免疫異常治療剤、Abdominal cavity inflammation (腹膜炎等) 、慢性関節リウマチ、関節炎、クローン病、癌悪液質、糖尿病性網膜症、乾せん、虚血性疾患、アルツハイマーなどの予防および治療のための薬剤としても有用である。

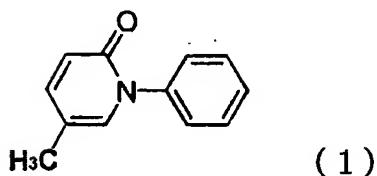
以上のように、本発明のアポトーシス関連因子阻害剤は、その標的因子が明らかであるために、アポトーシスが関連する疾患に対して、より合理的で有効な治療手段、あるいは予防手段を提供する。

- 3 9 -

請求の範囲

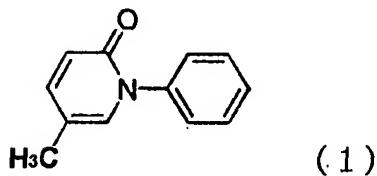
1. 式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、アボトーシスの阻害剤。

式 (1) :



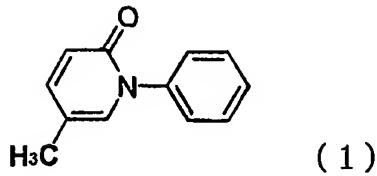
2. 式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、インターロイキン-12、インターロイキン18、およびインターフェロン γ からなる群から選択される炎症性サイトカインの産生抑制剤。

式 (1) :



3. 式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼの阻害剤。

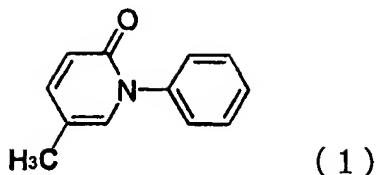
式 (1) :



4. 式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、Jun-キナーゼおよび/または p38 MAP キナーゼ阻害剤。

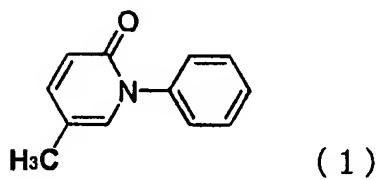
式 (1) :

- 4 0 -



5. 請求項 1 に記載のアポトーシス阻害剤を主成分として含有するアポトーシスに起因する疾患の治療剤。
6. 式 (1) で示される 5-メチル-1-フェニル-2-(1H)-ピリドンを主成分として含有する、肝炎の治療剤。

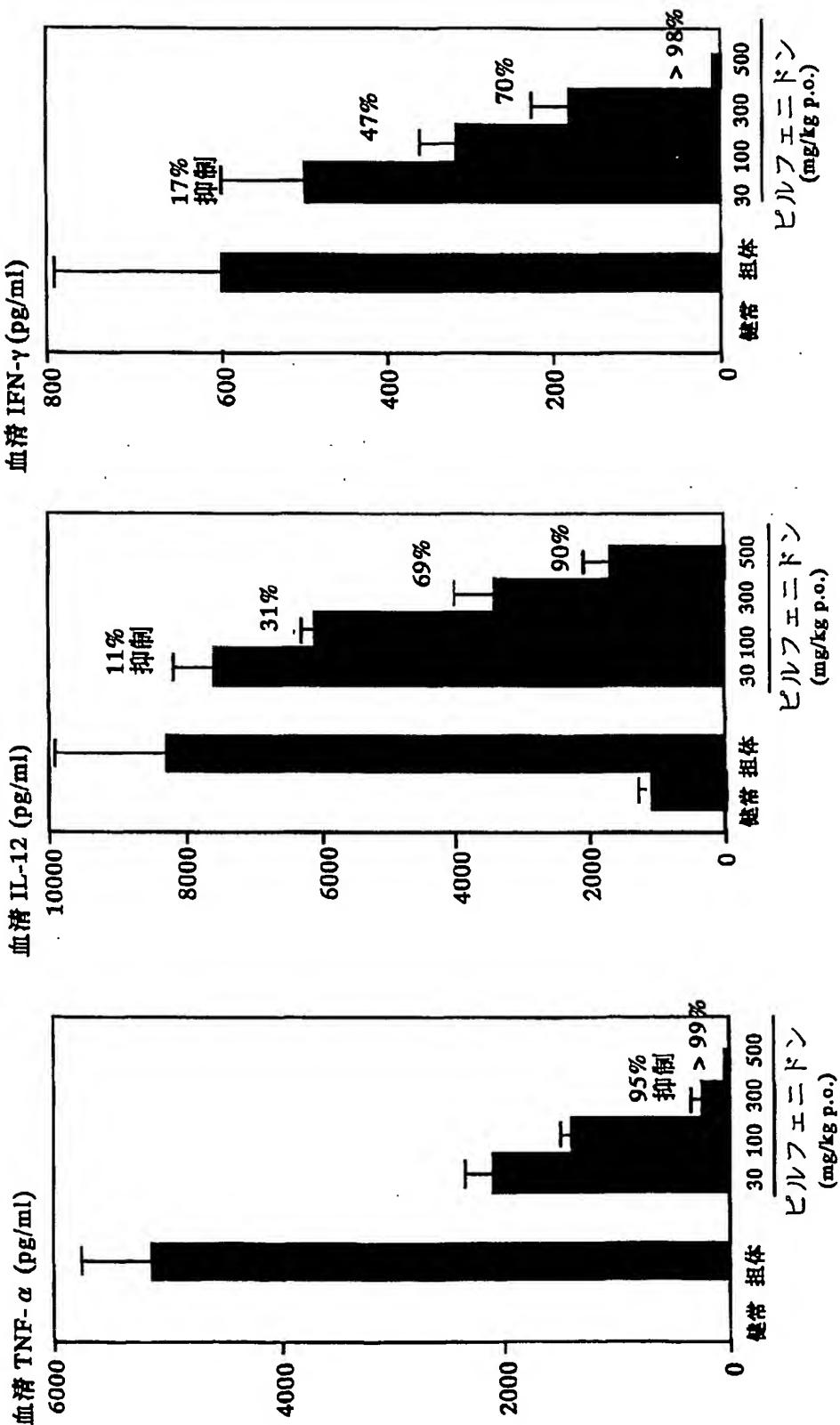
式 (1) :



7. 肝炎が劇症肝炎である請求項 6 に記載の治療剤。
8. 請求項 3 に記載のポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼの阻害剤を主成分として含有するネクロシスに起因する疾患の治療剤。
9. 疾患が急性肝炎である請求項 8 に記載の治療剤。

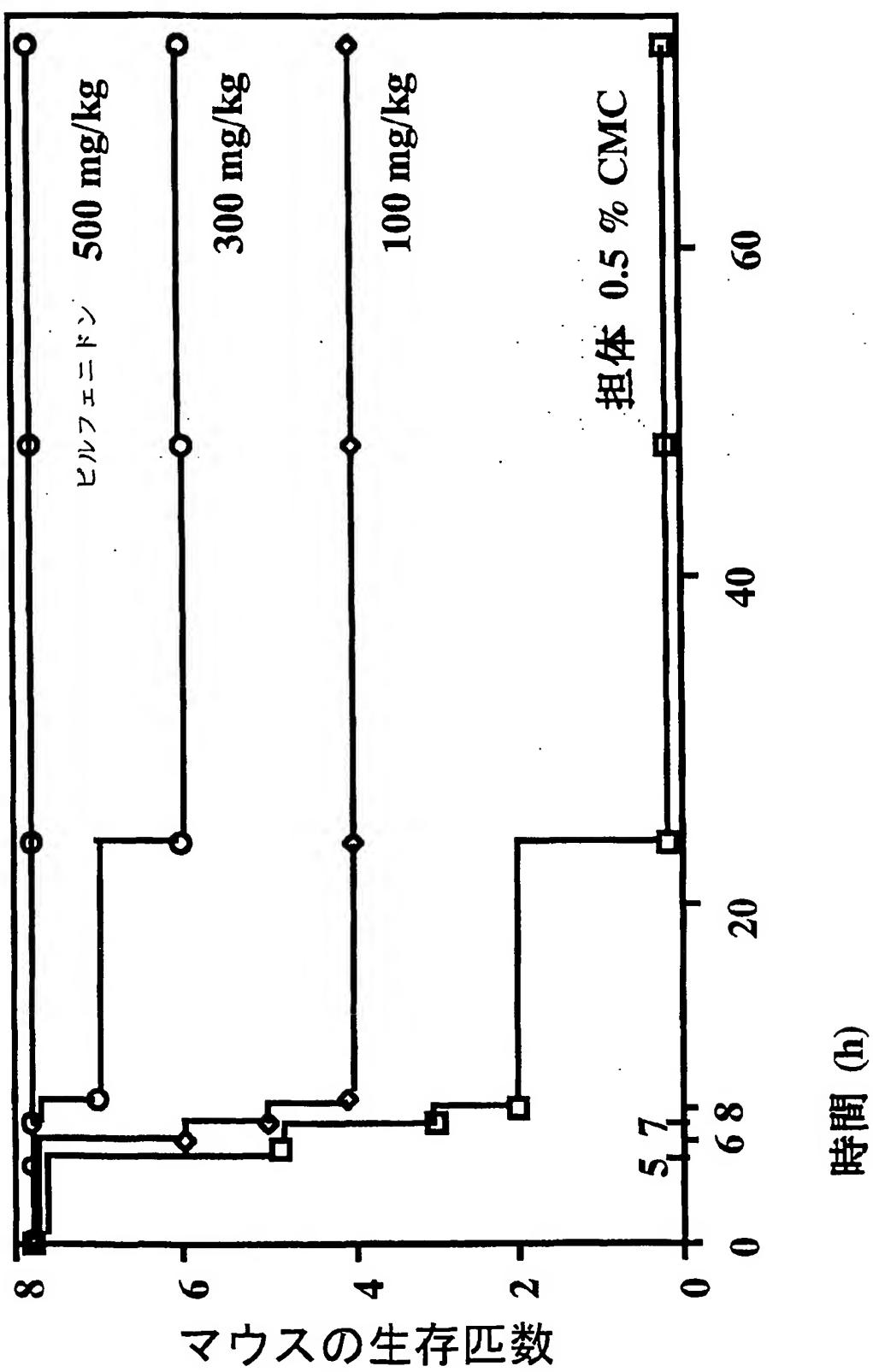
1 / 3 4

図 1



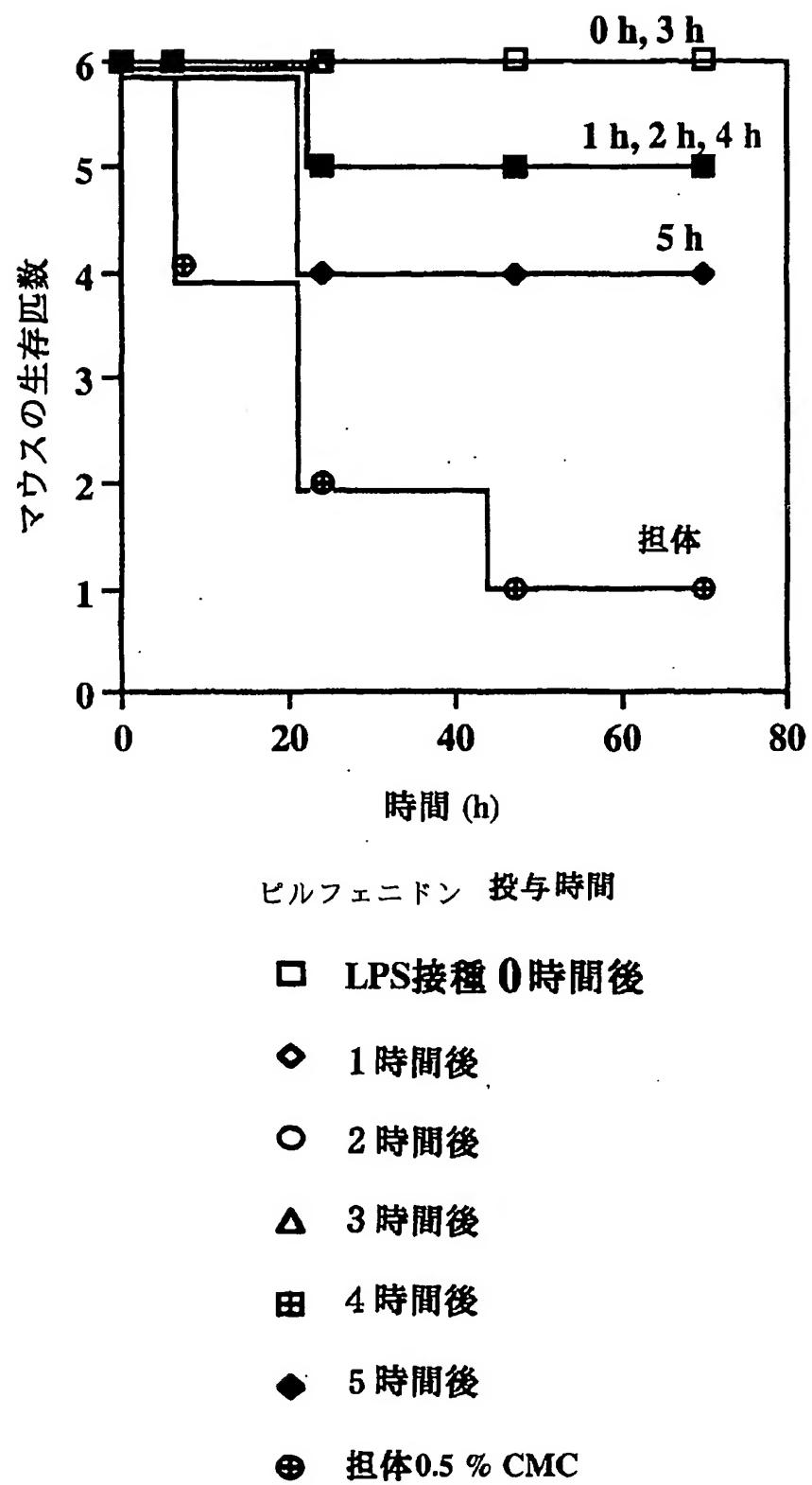
2 / 3 4

図 2



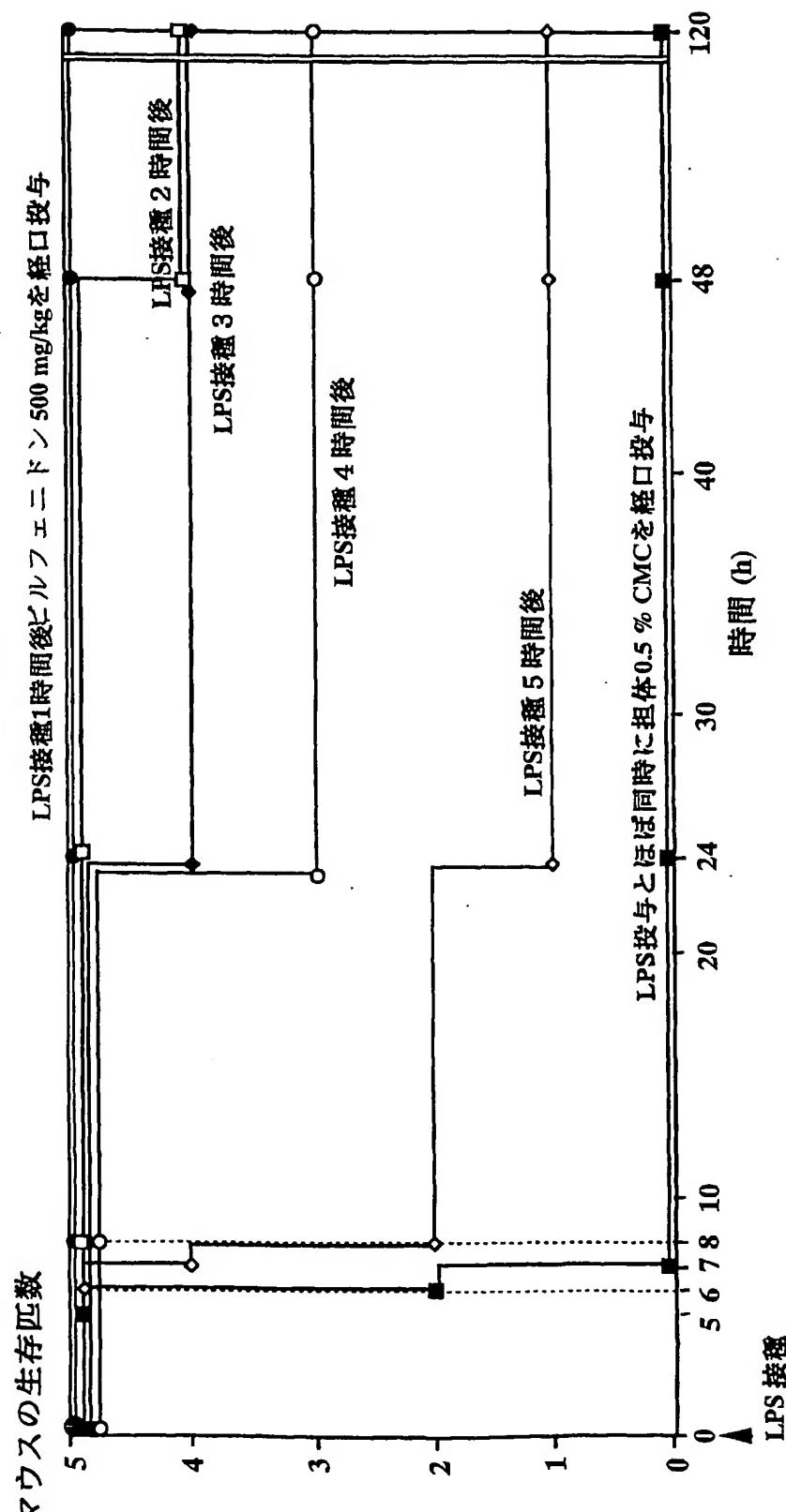
3 / 34

図 3



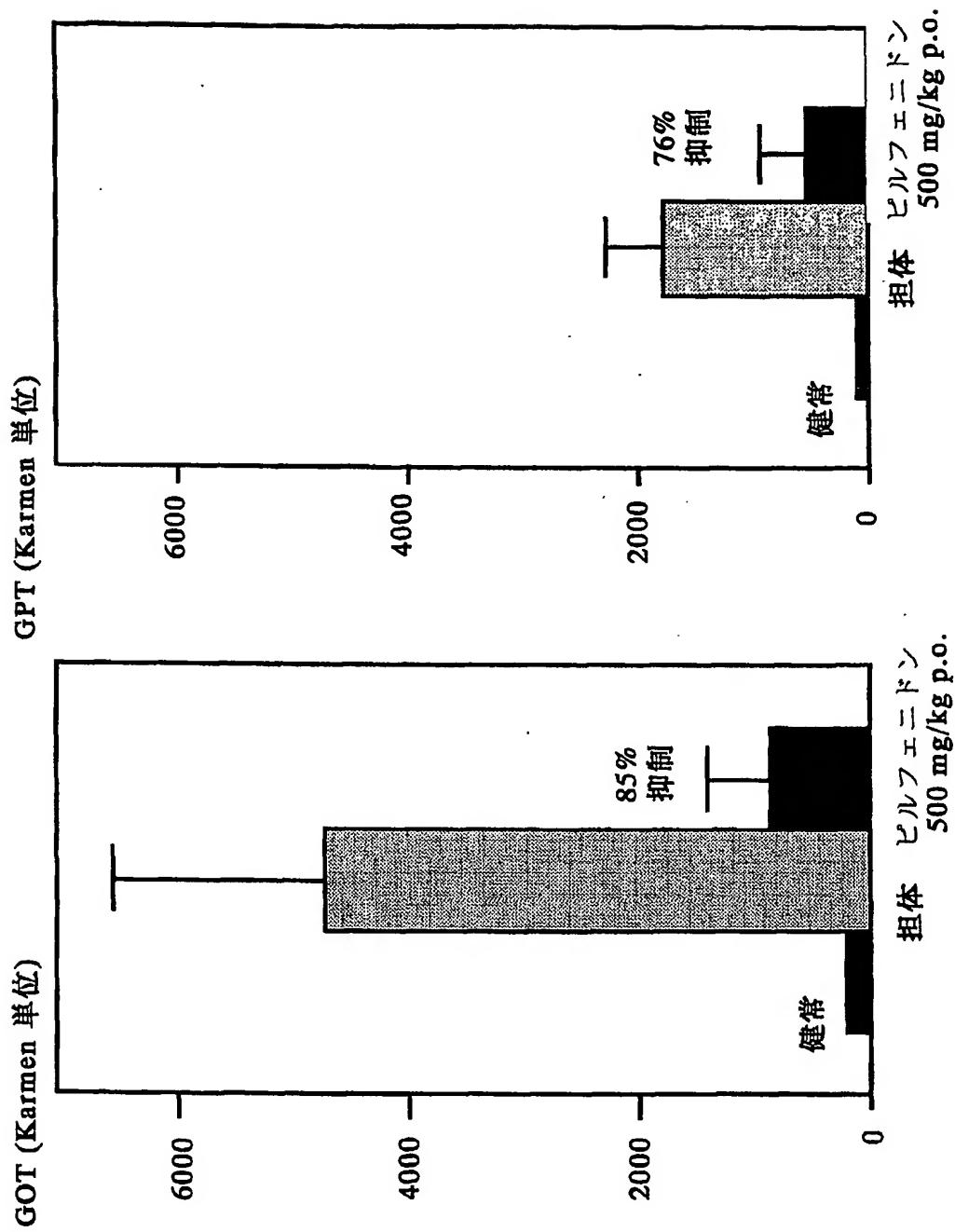
4 / 3 4

图 4



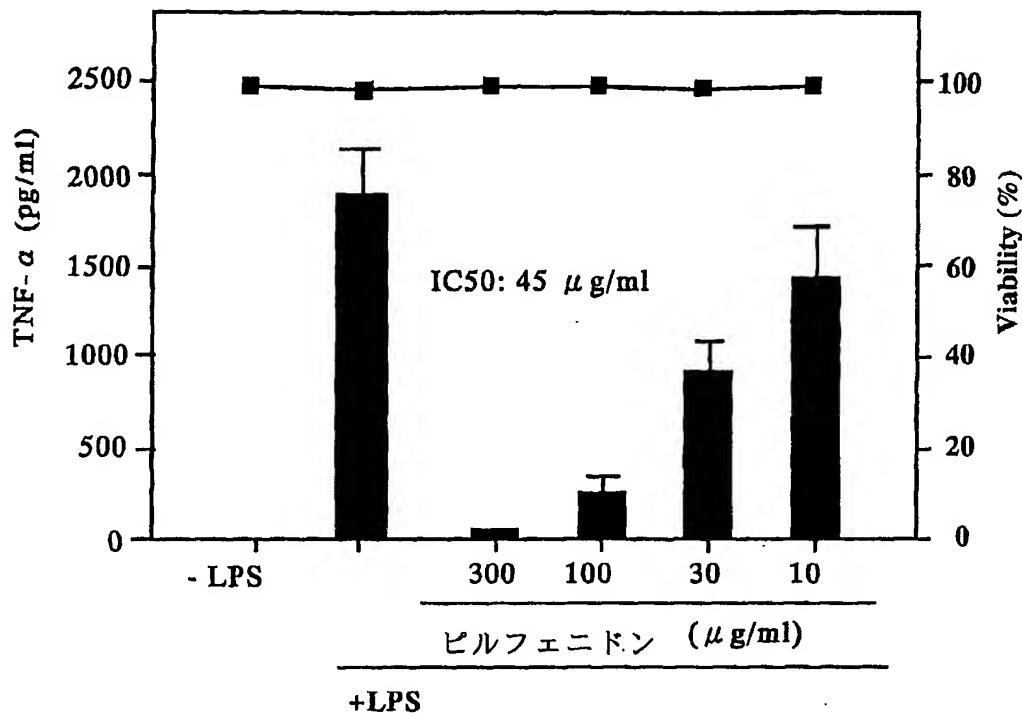
5 / 34

図 5



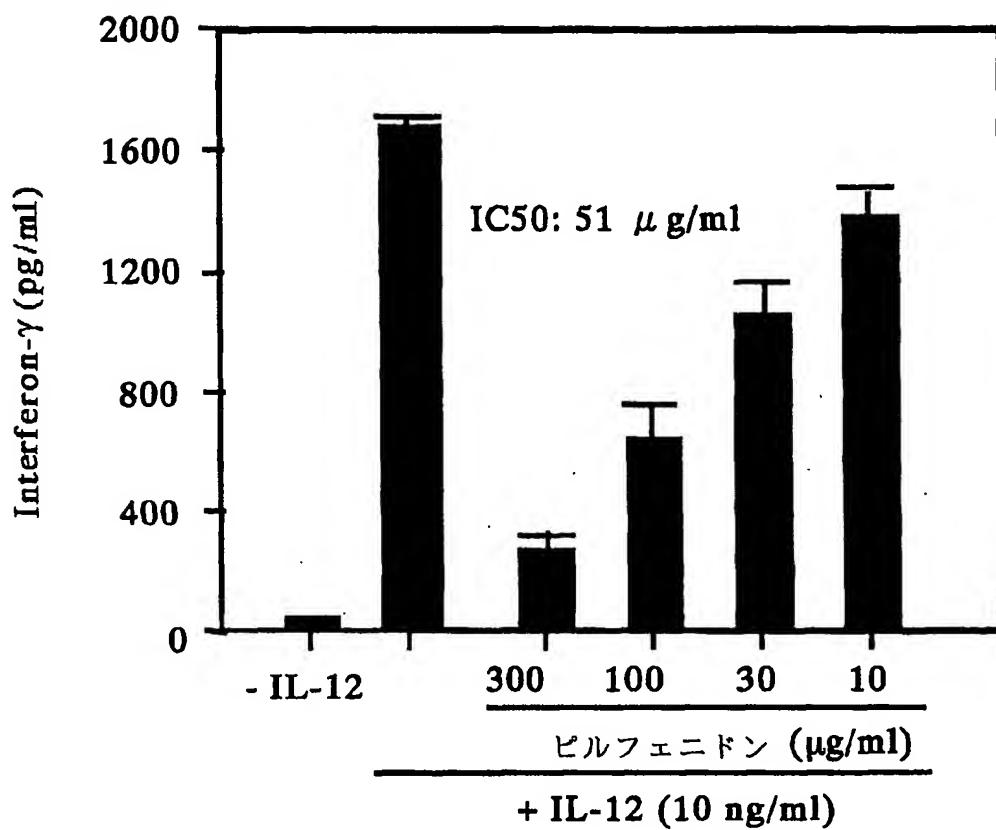
6 / 3 4

図 6



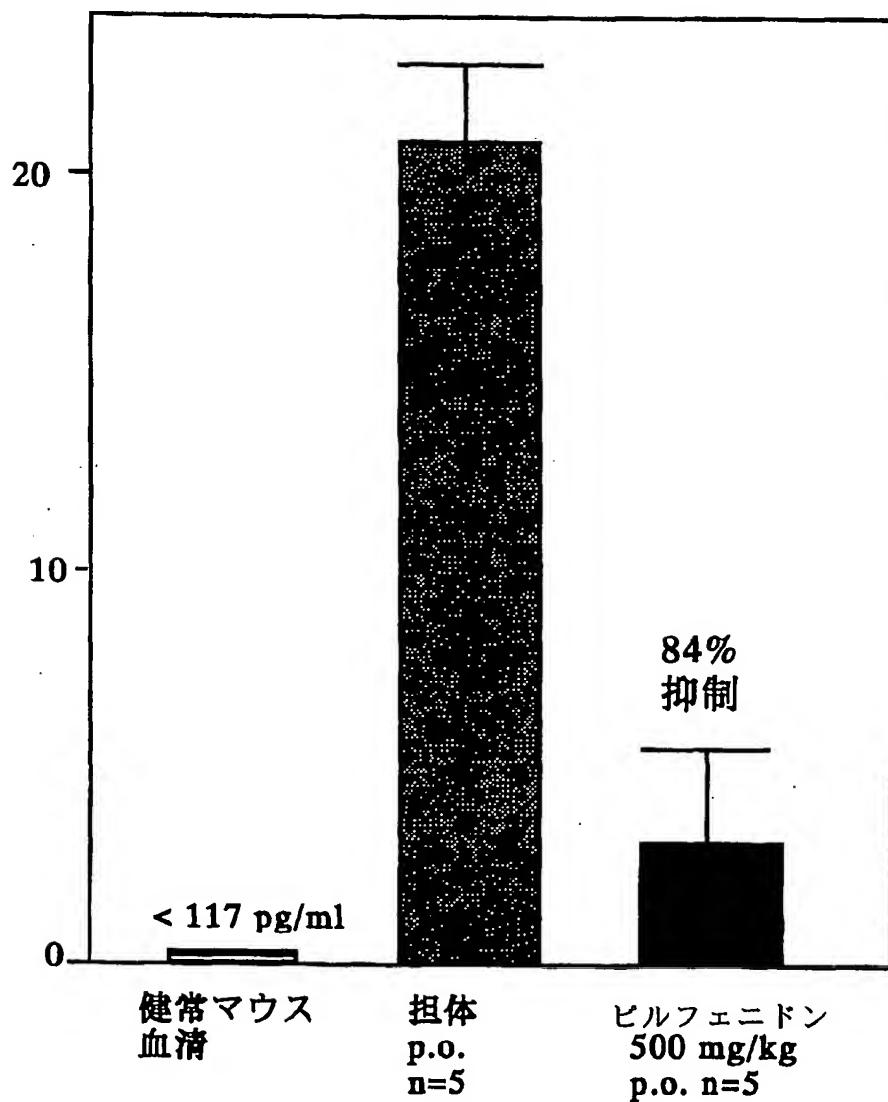
7 / 34

図 7



8 / 3 4

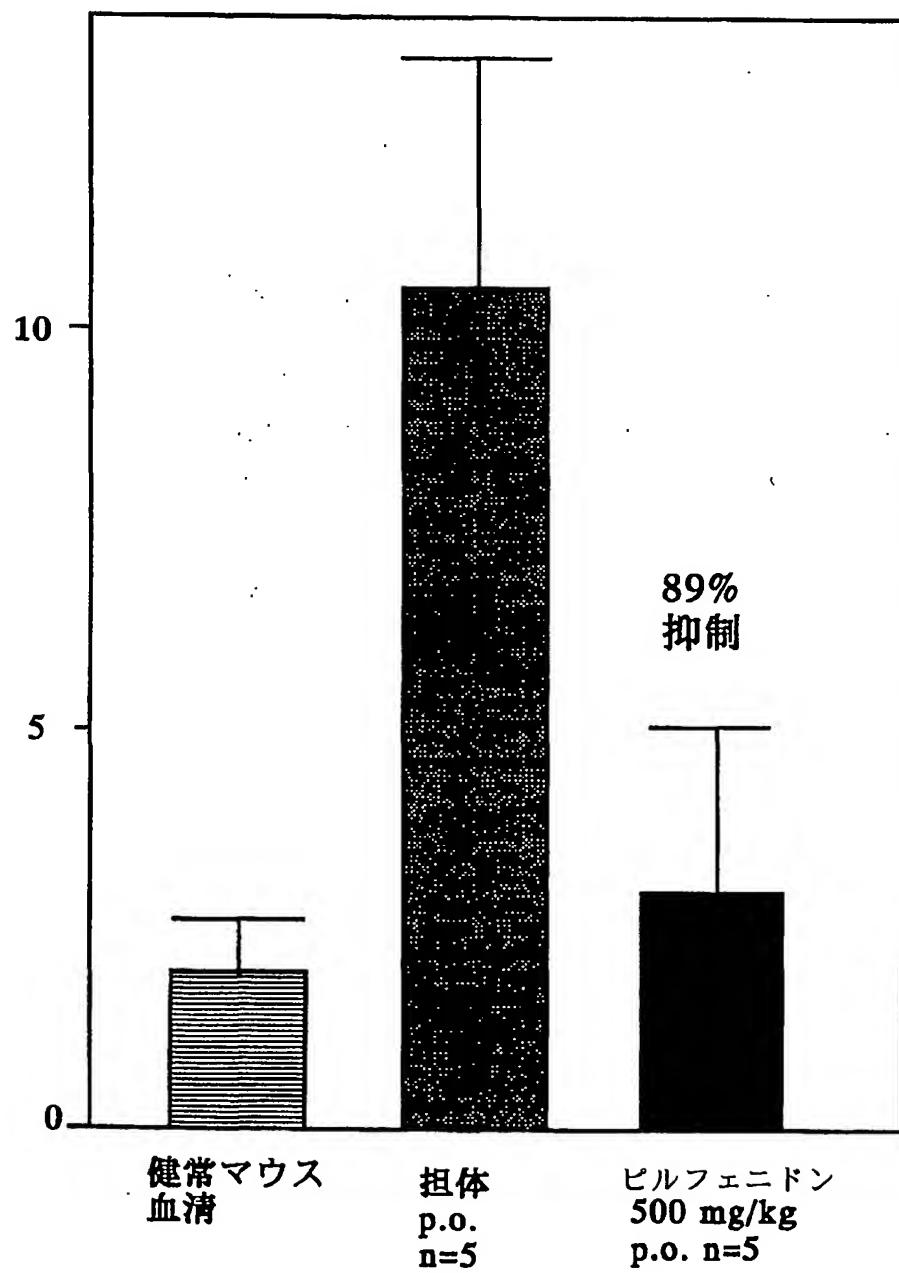
図 8

血清 TNF- α (ng/ml)

9 / 34

図 9

血清 IL-18 (ng/ml)



10 / 34

図 10

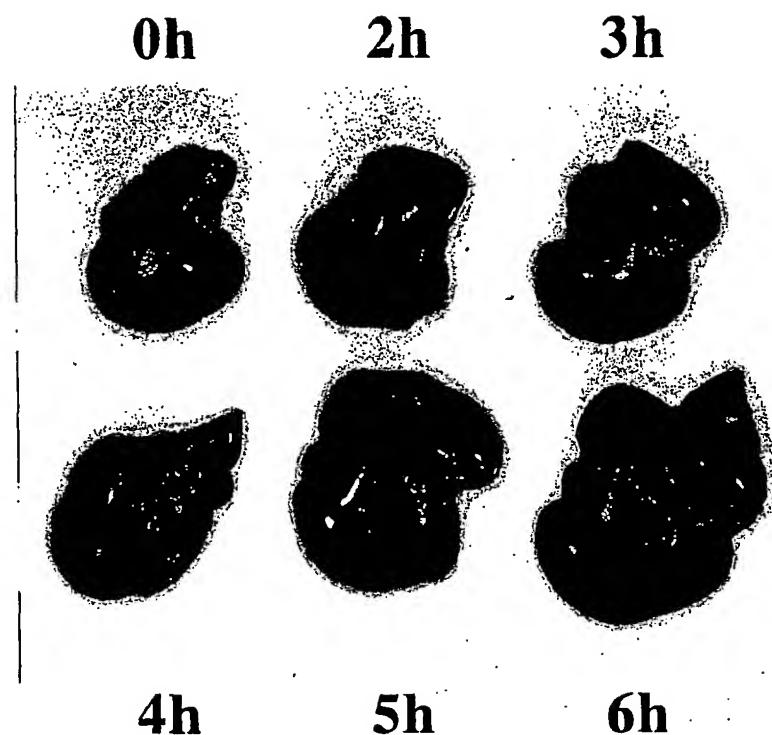
-LPS

+LPS



11 / 34

図 11



12 / 34

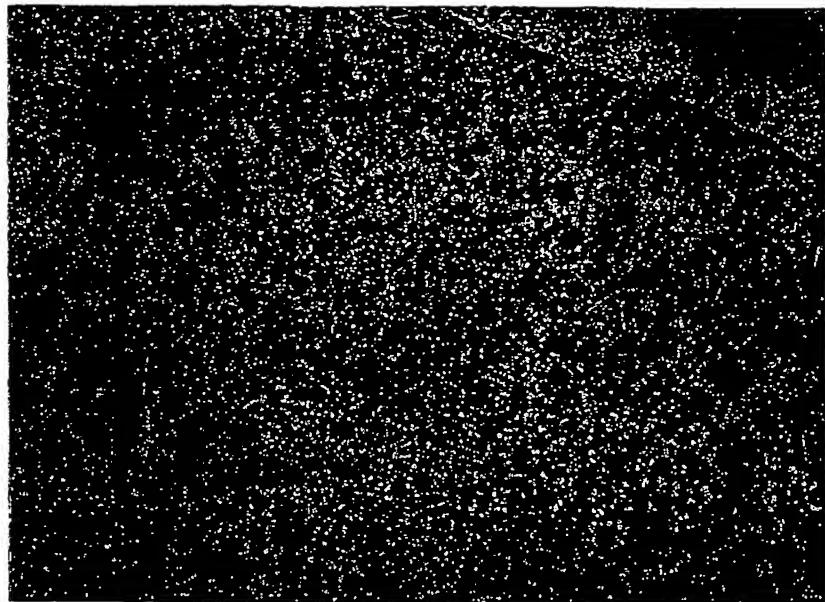
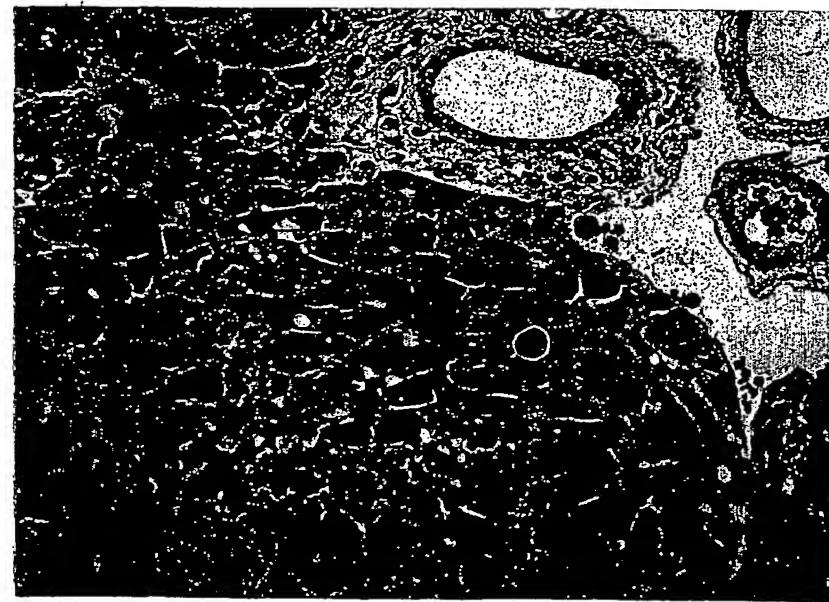
図 12

-LPS +LPS +LPS
-ビルフェニドン -ビルフェニドン +ビルフェニドン
5分前投与 4時間後投与



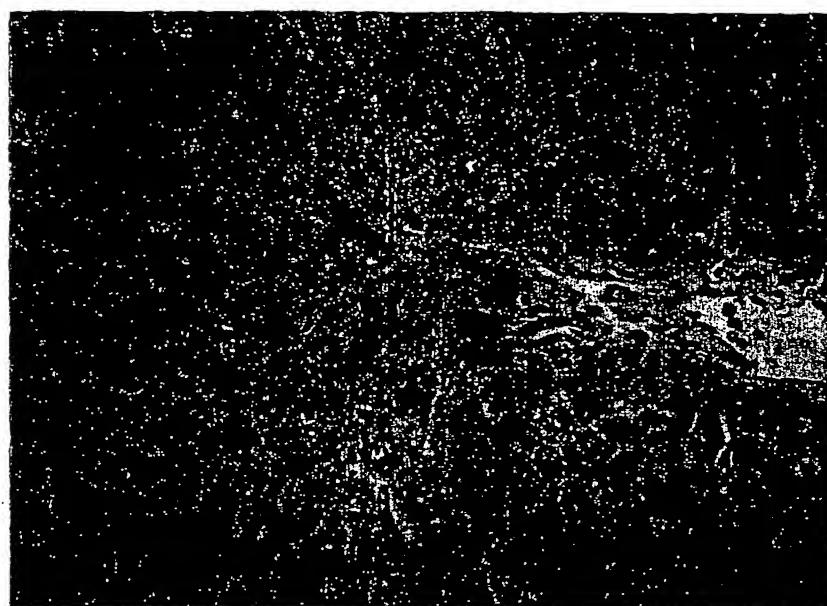
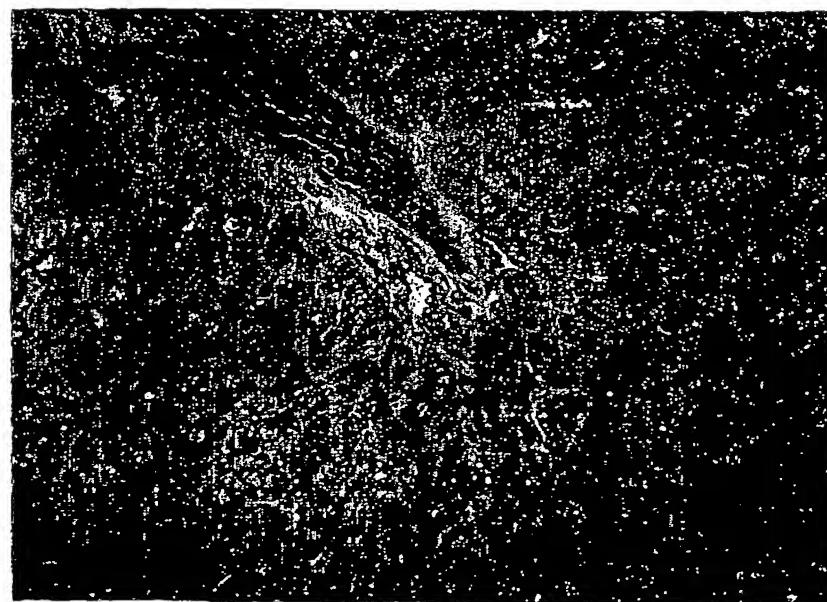
13/34

図13

A**B**

14/34

図14

A**B**

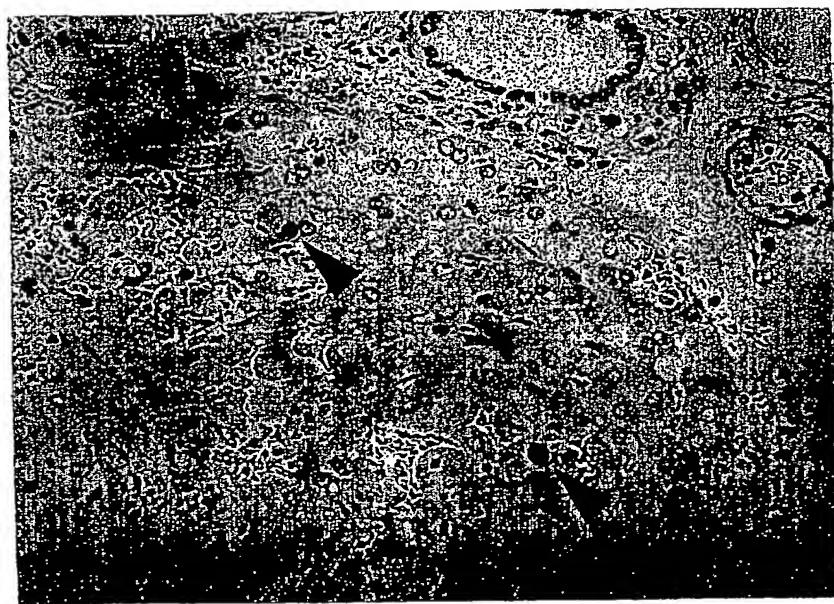
15 / 34

図 15

A



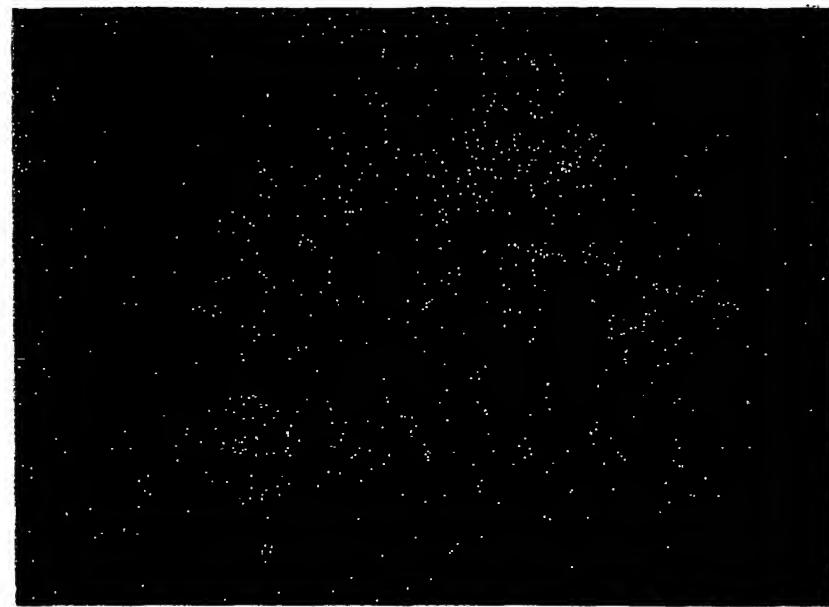
B



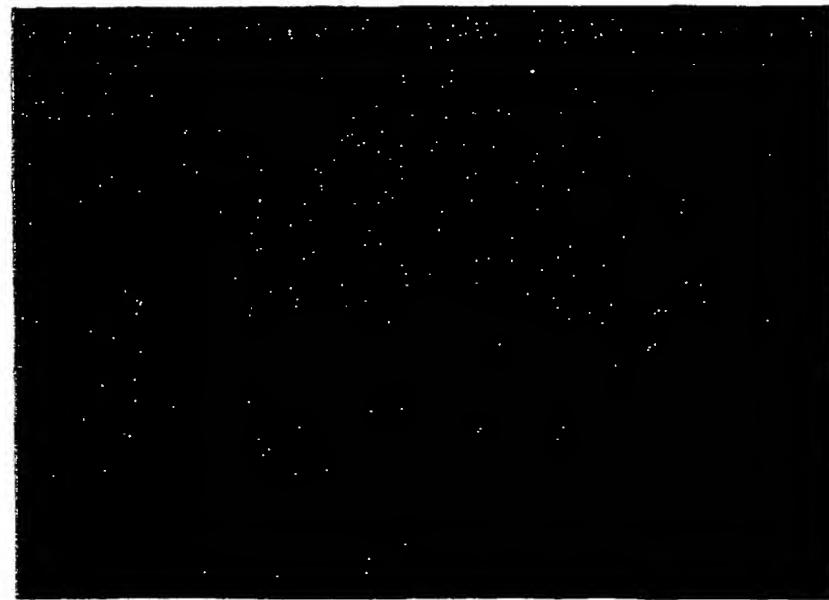
16/34

図16

A



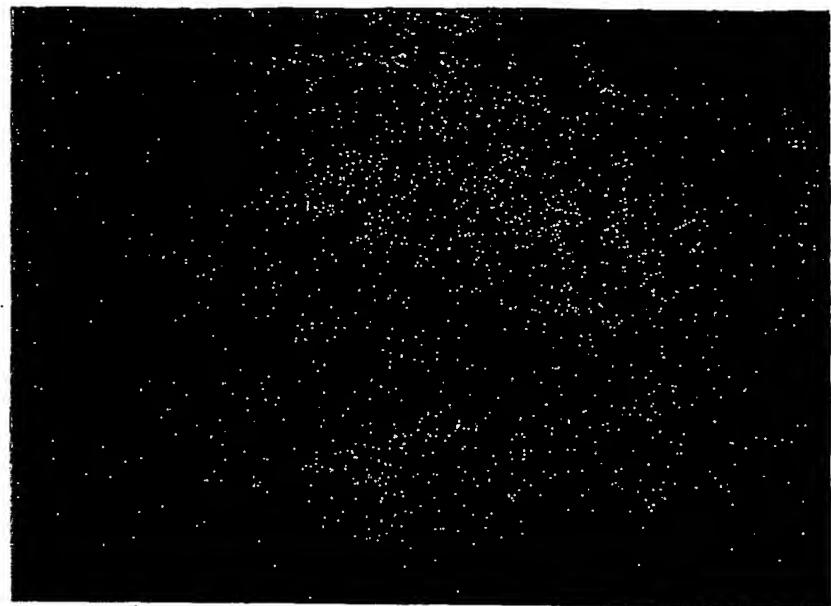
B



17/34

図17

A



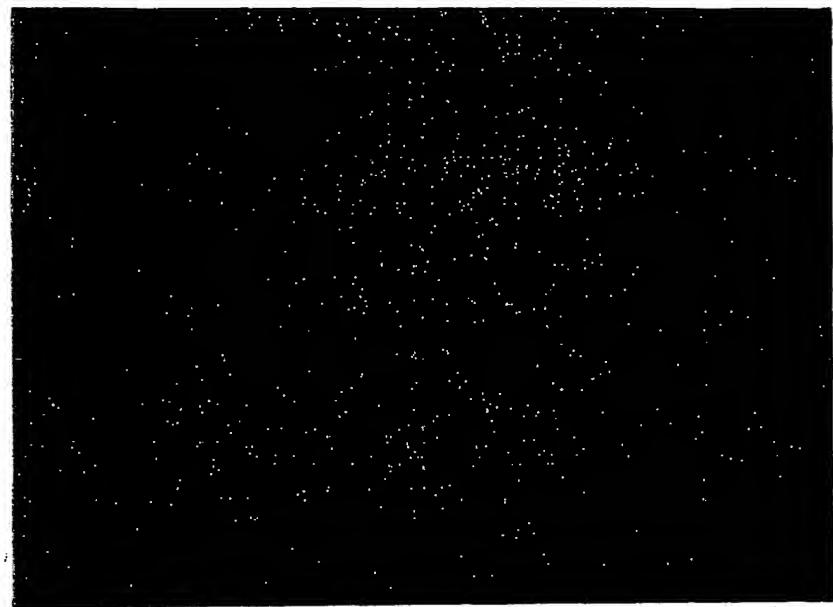
B



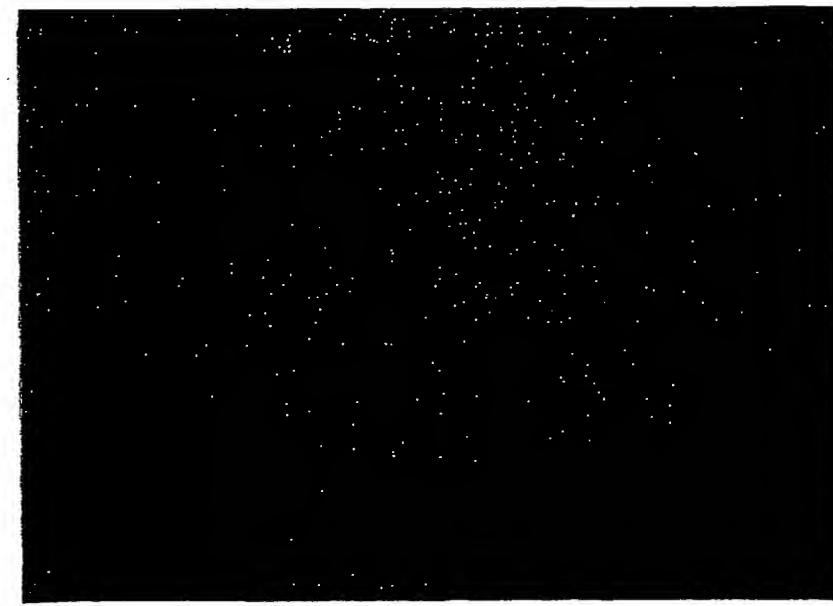
18/34

図18

A



B



19/34

図19

A



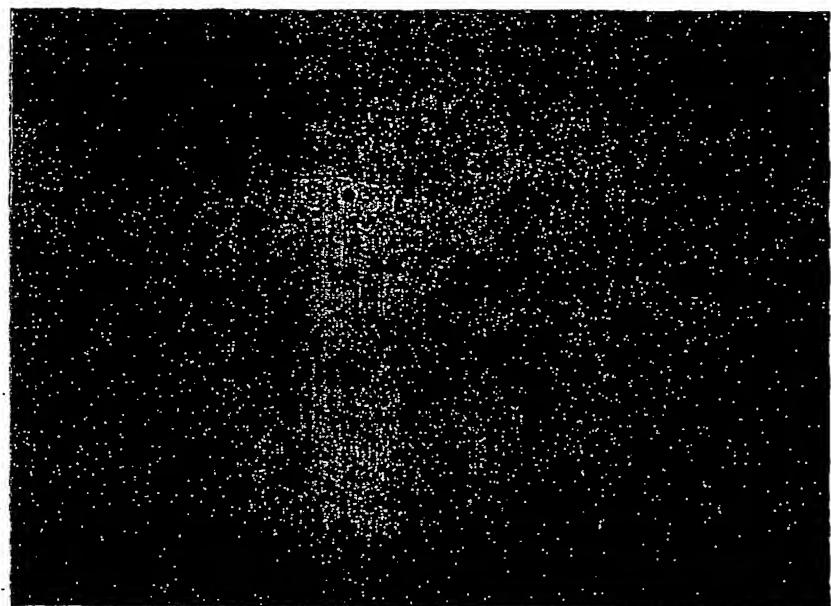
B



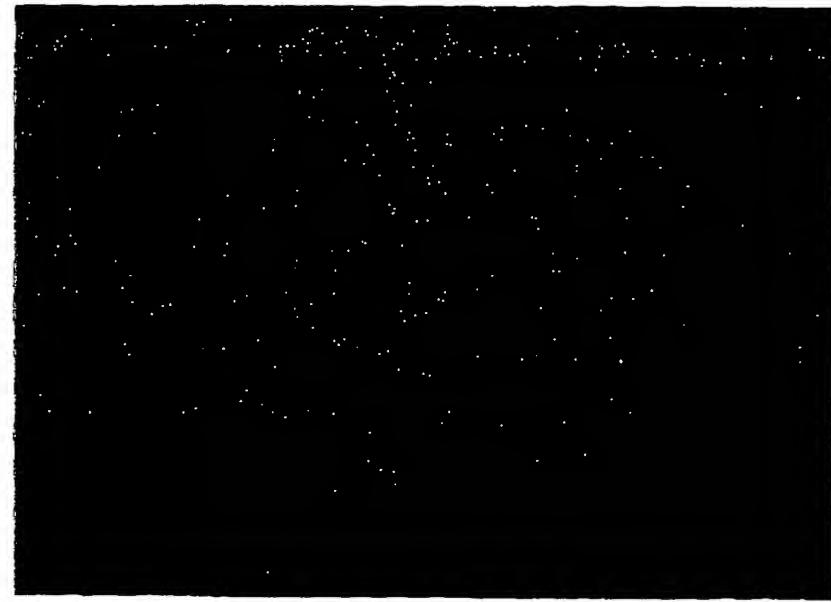
20 / 34

図 20

A

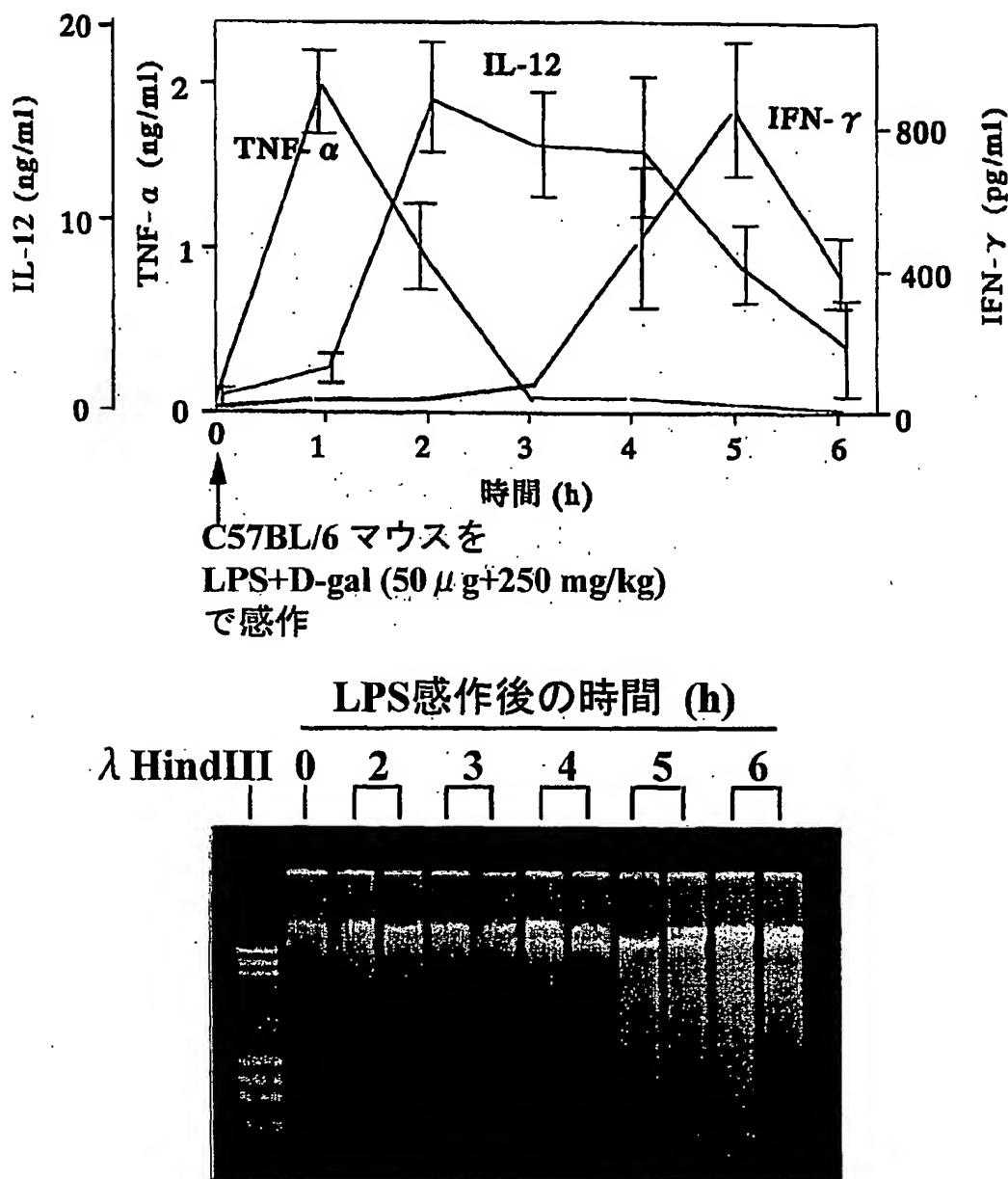


B



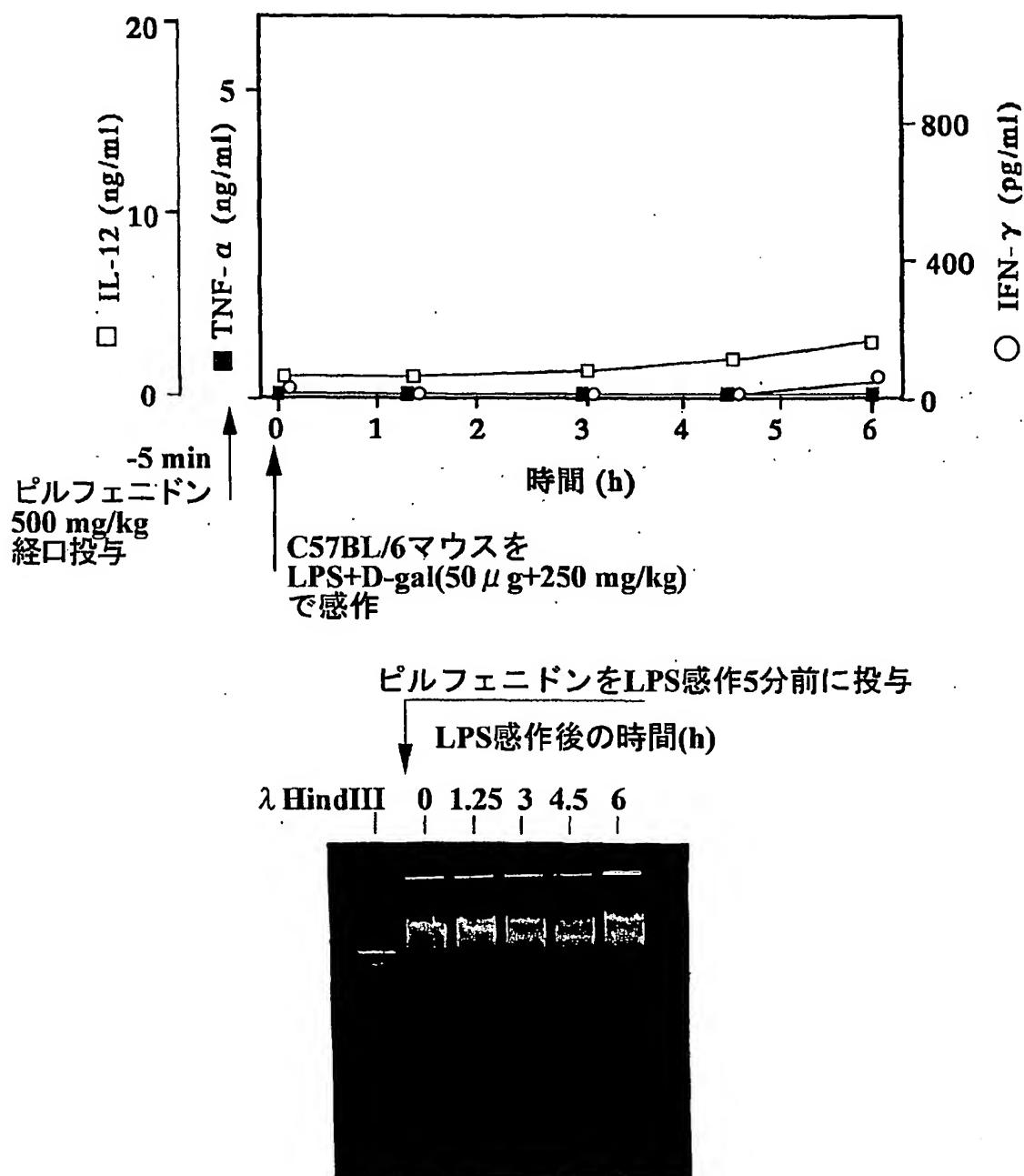
21/34

図21



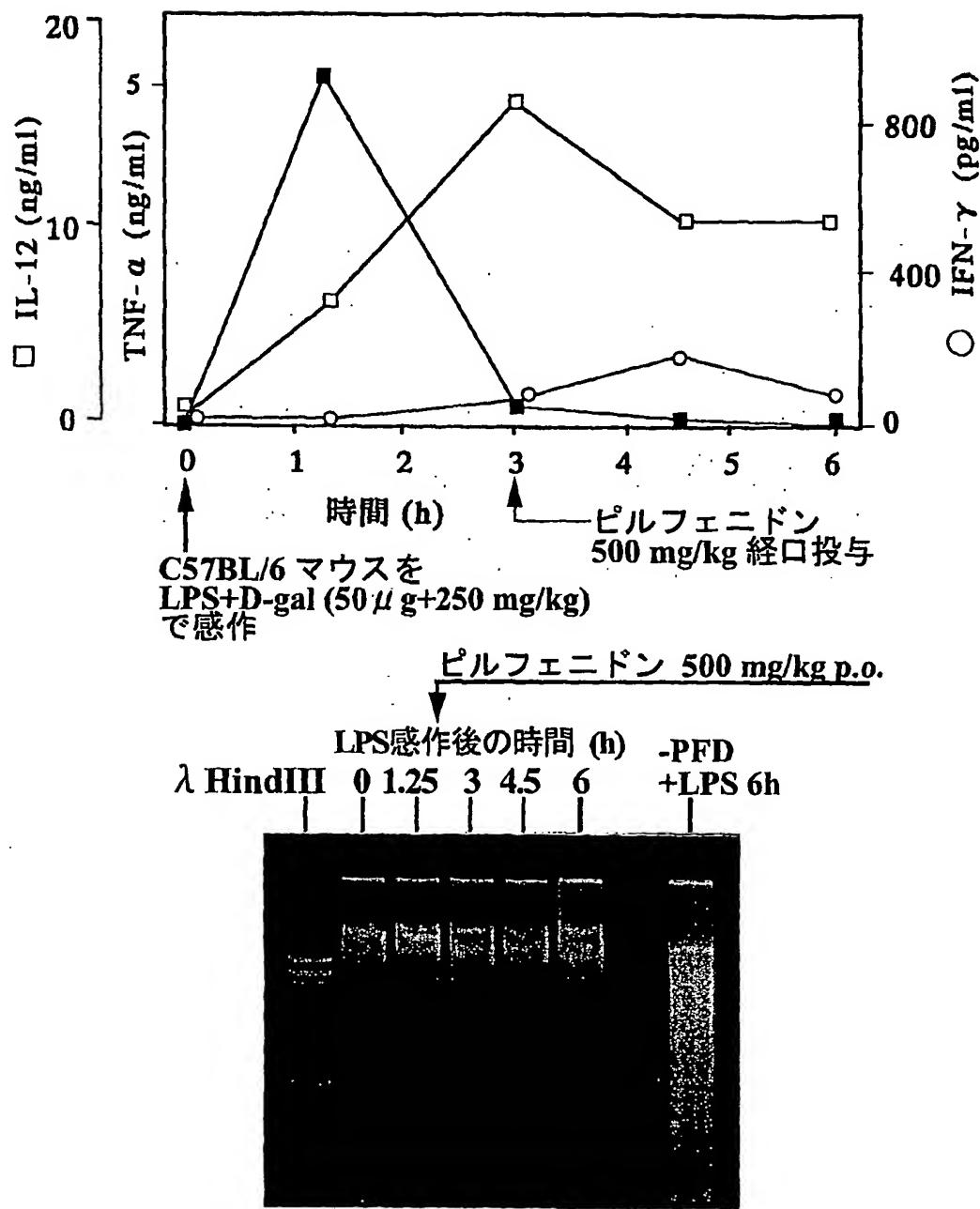
22/34

図22



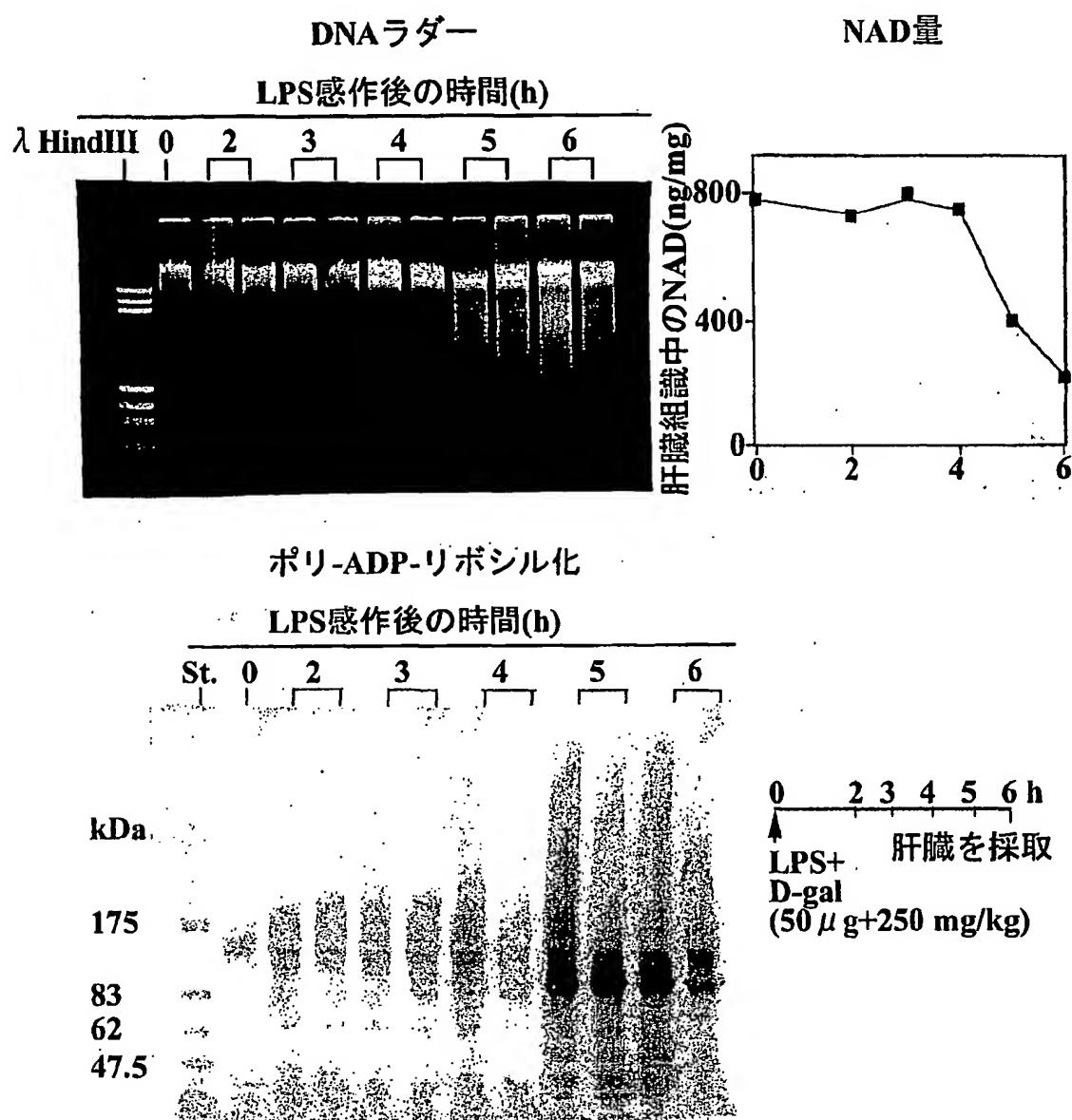
23 / 34

図 23



24/34

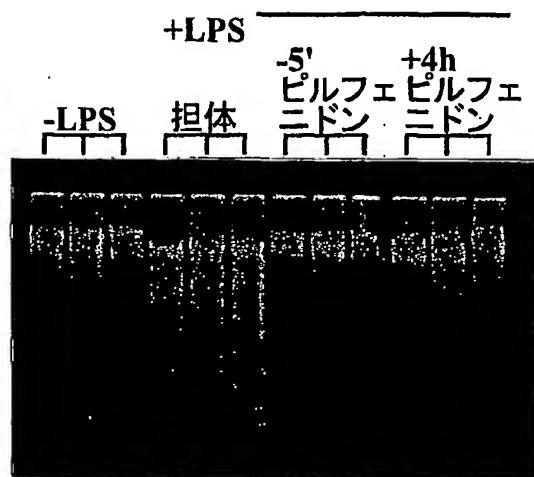
図 24



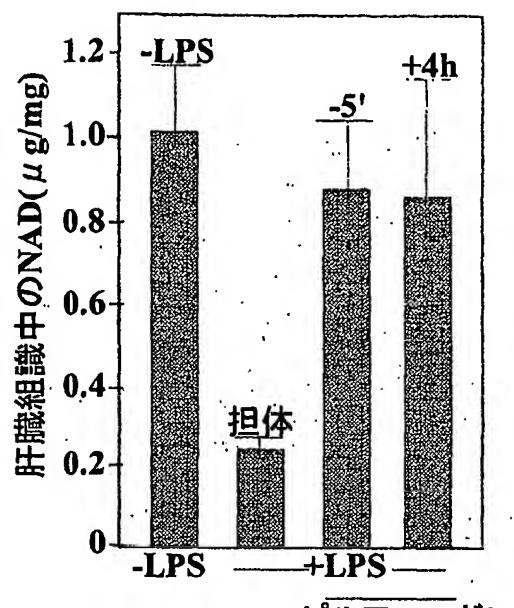
25 / 34

図 25

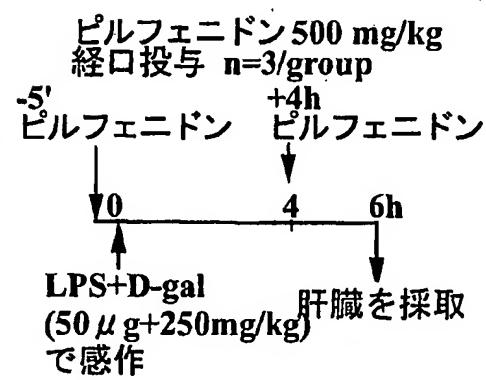
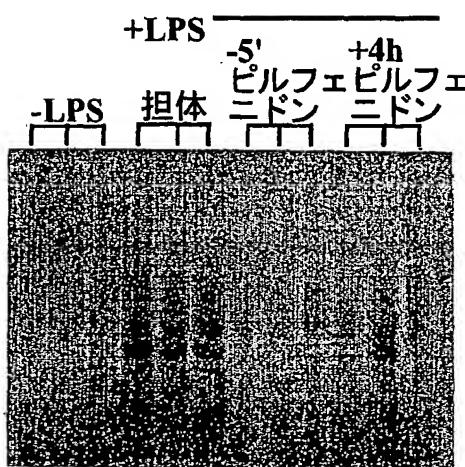
DNA ラダー



NAD量



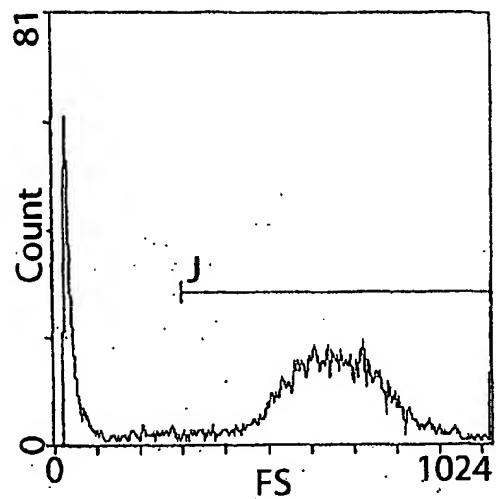
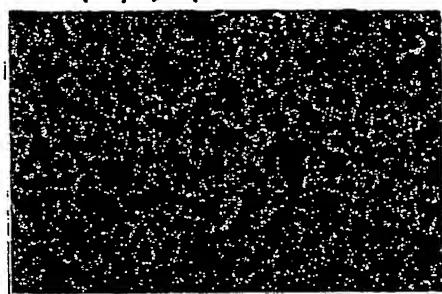
ポリ-ADP-リボシル化



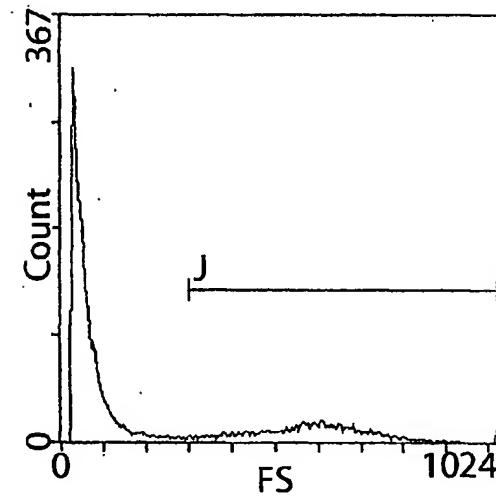
26 / 34

図 26

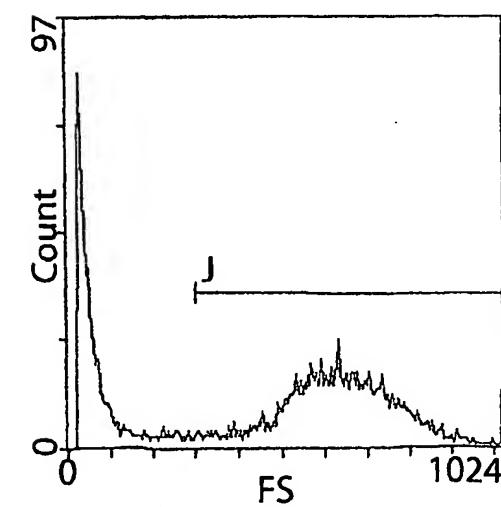
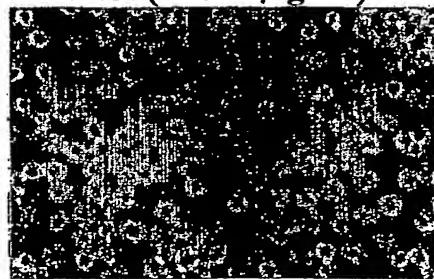
-エトポシド



+エトポシド

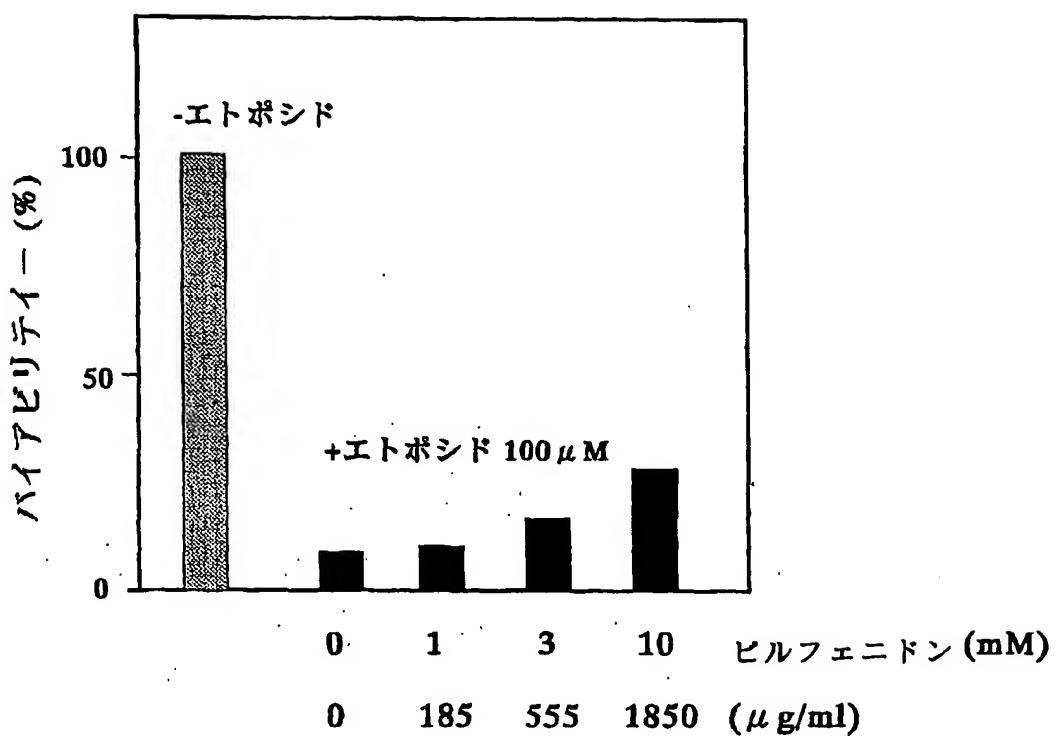


+エトポシド
+ピルフェニドン
10mM(=1850 μ g/ml)



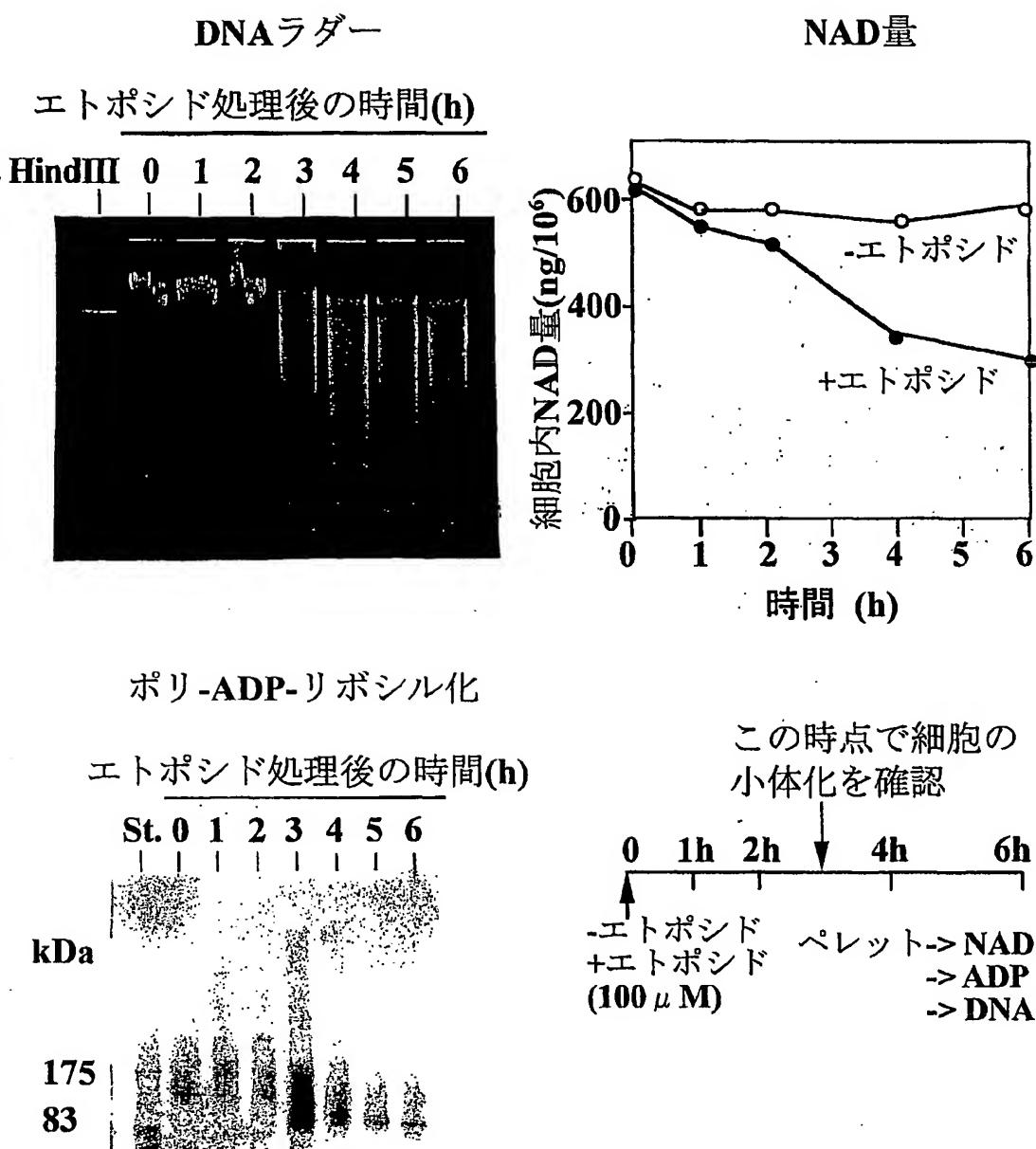
27/34

図27



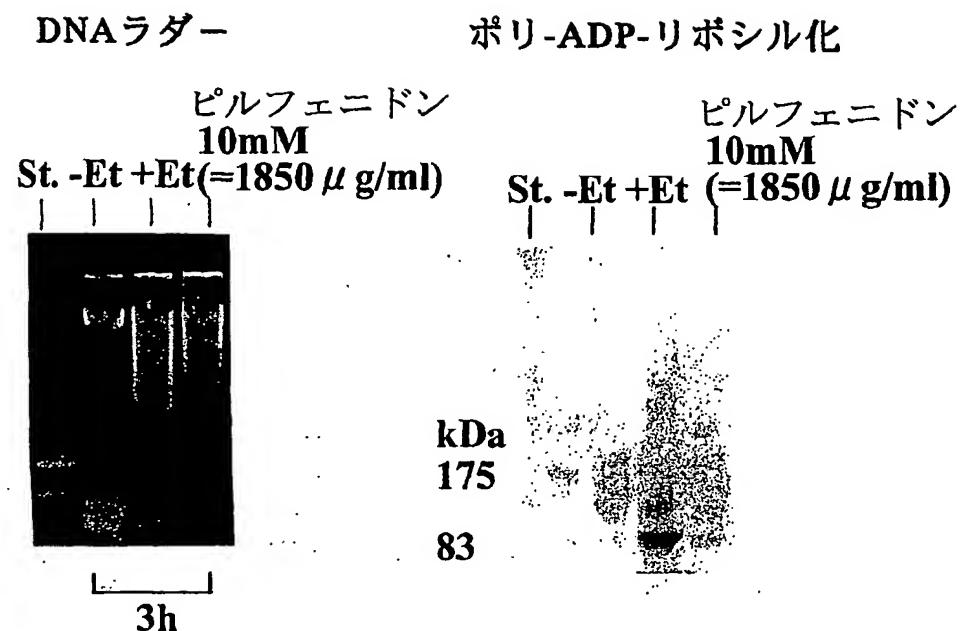
28 / 34

図28

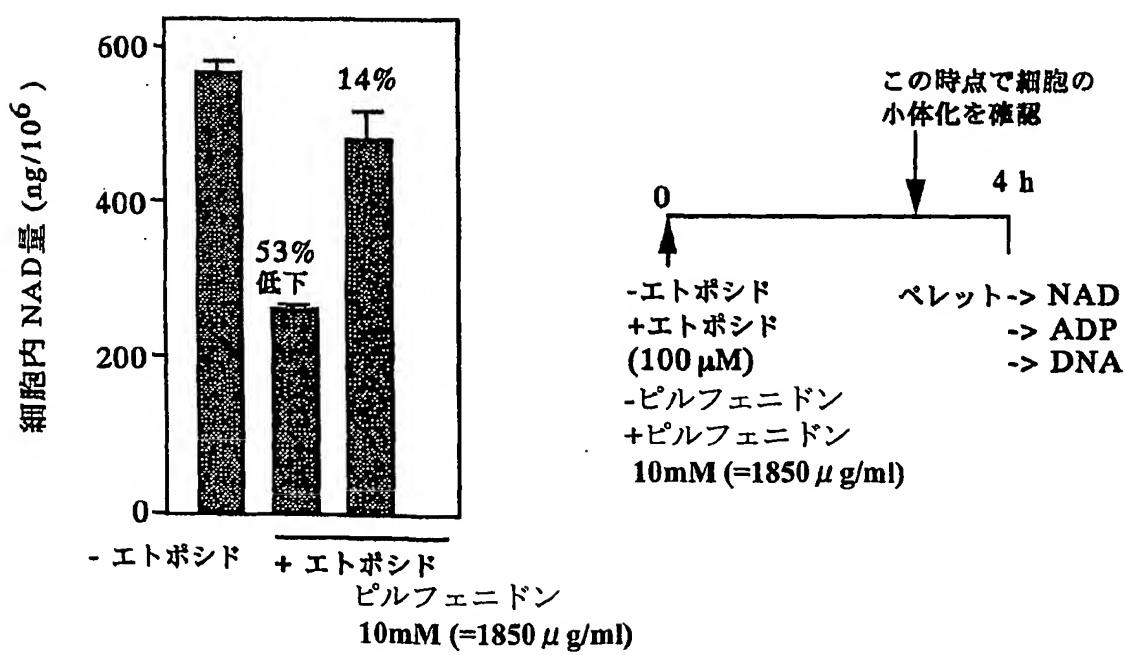


29 / 34

☒ 2 9

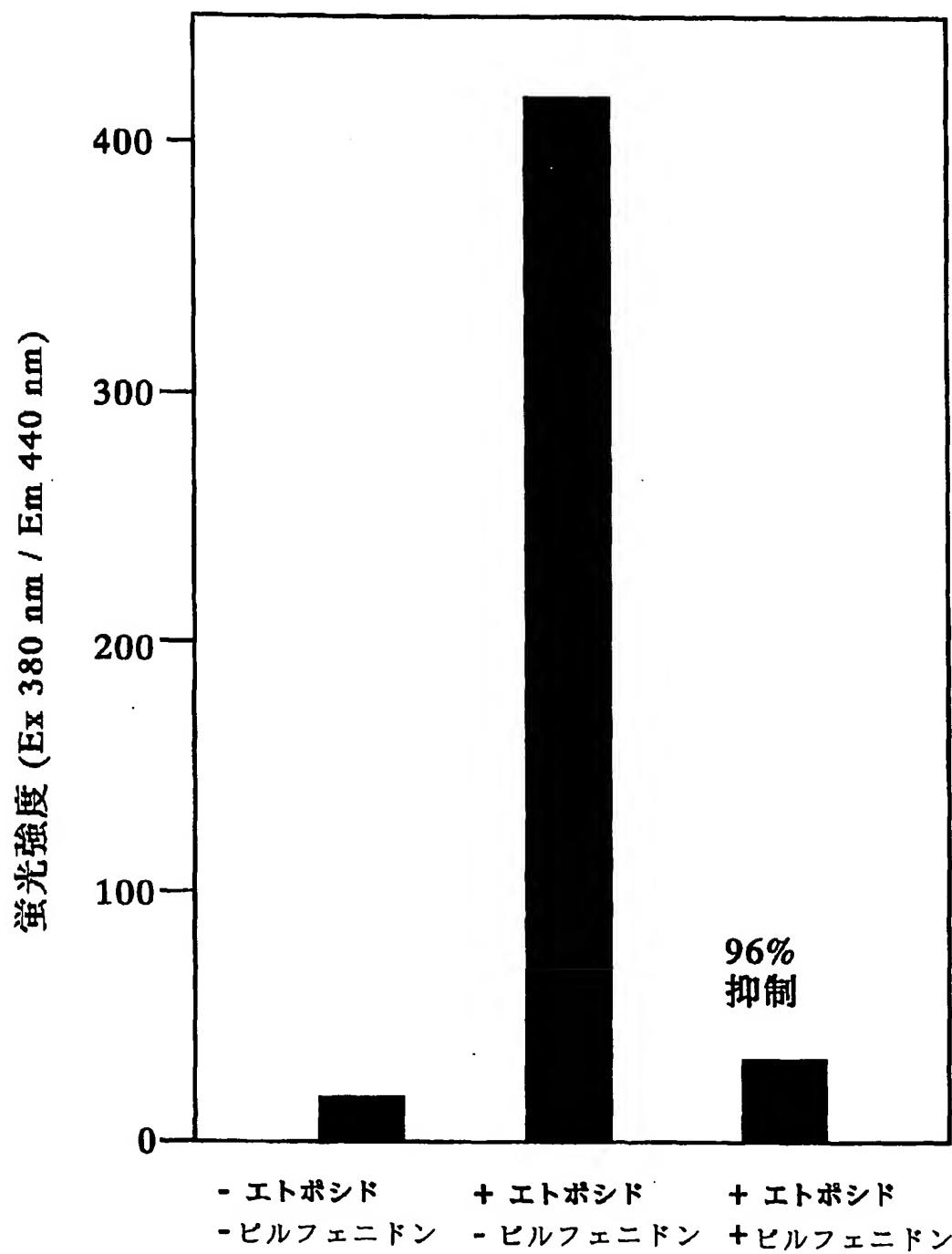


NAD量



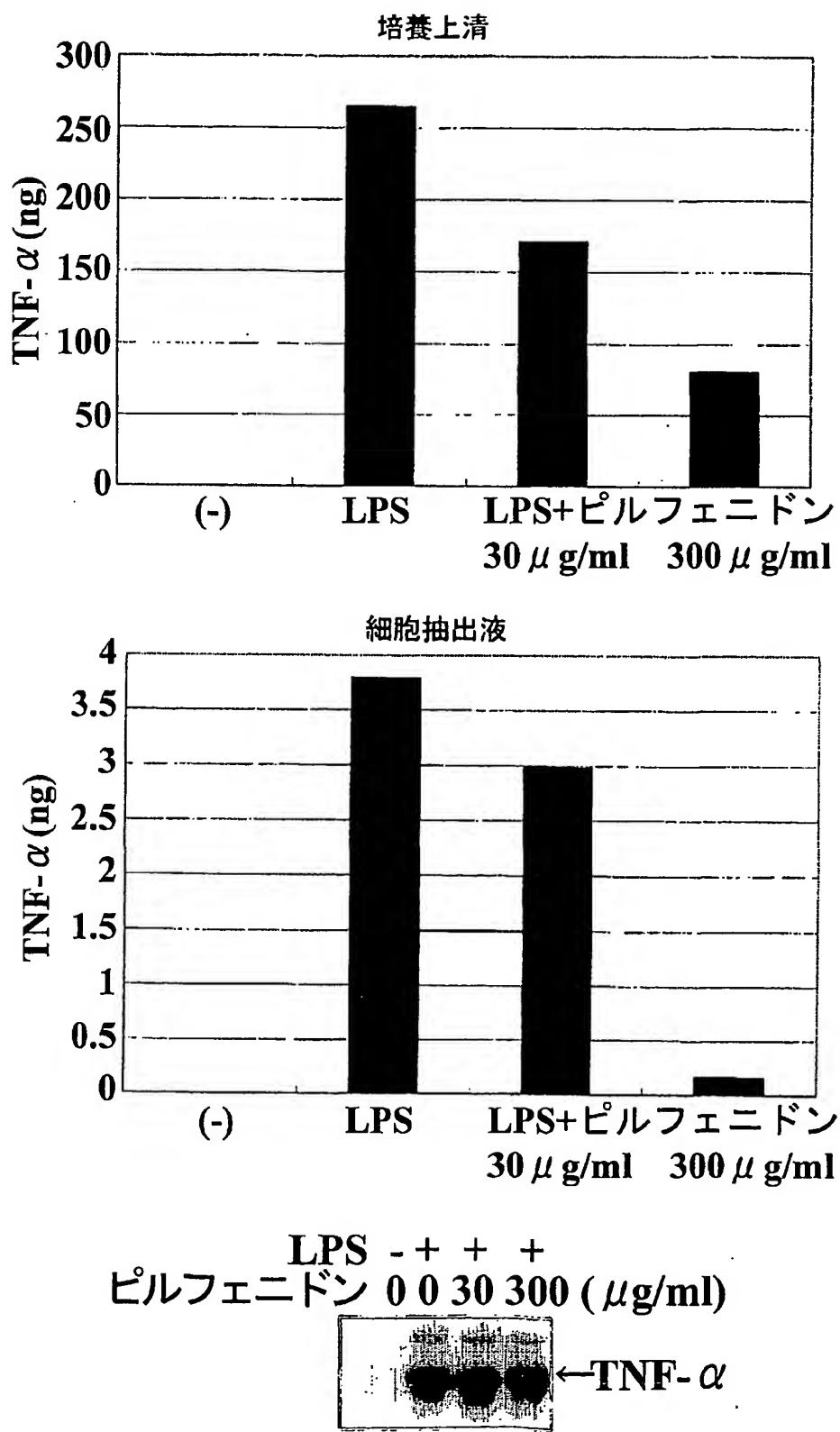
30 / 34

図 30



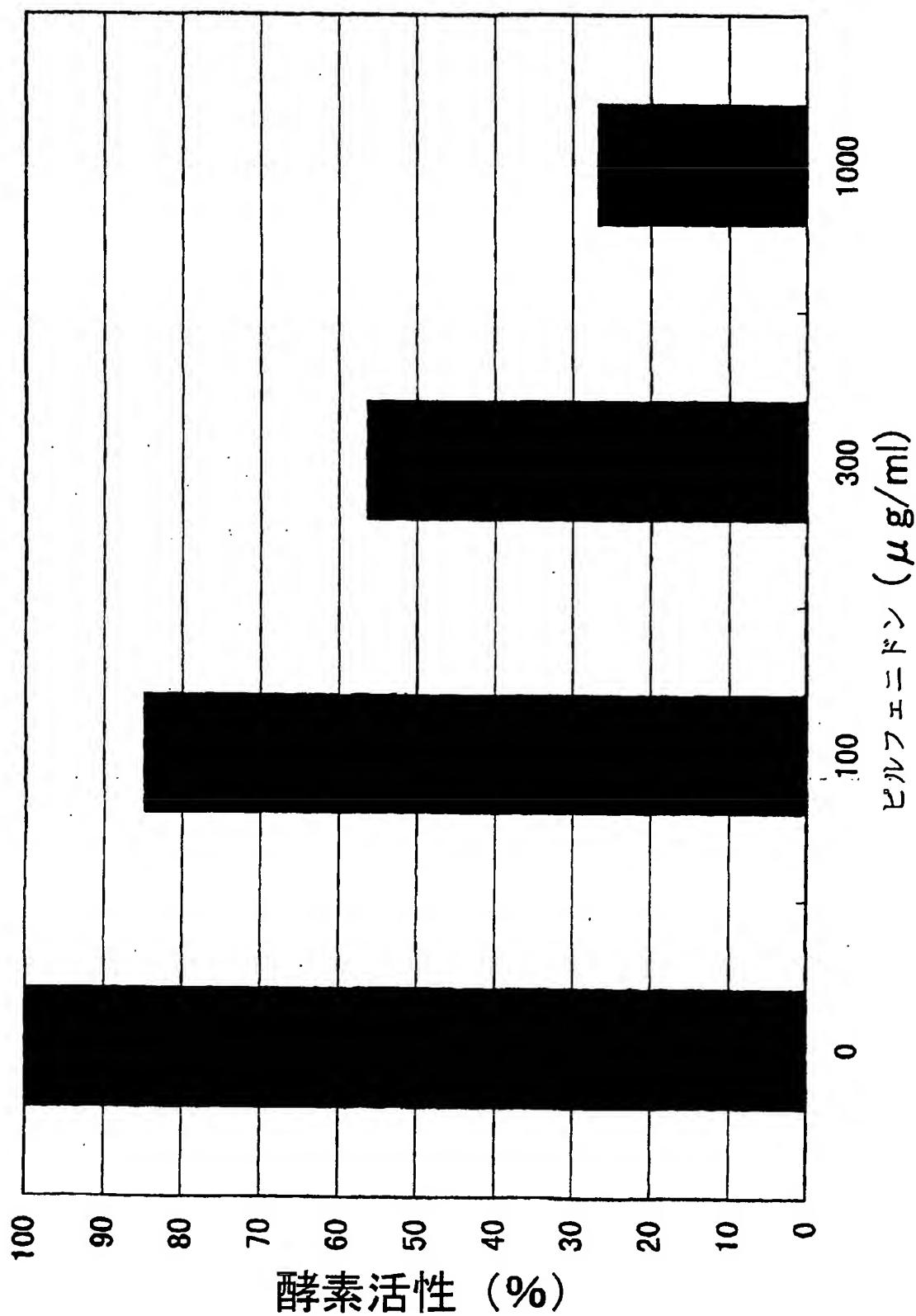
31 / 34

図 3 1



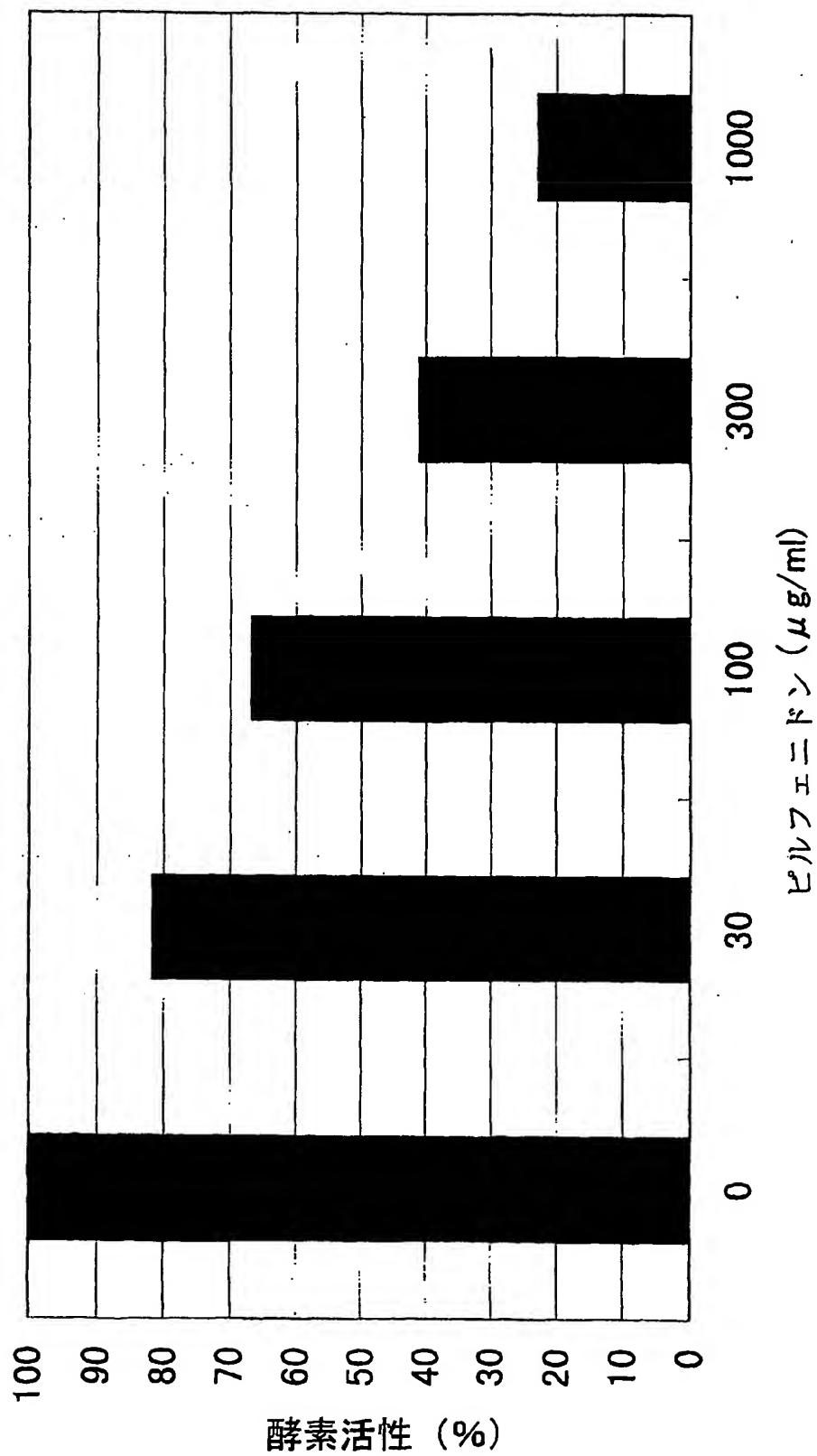
32/34

図32



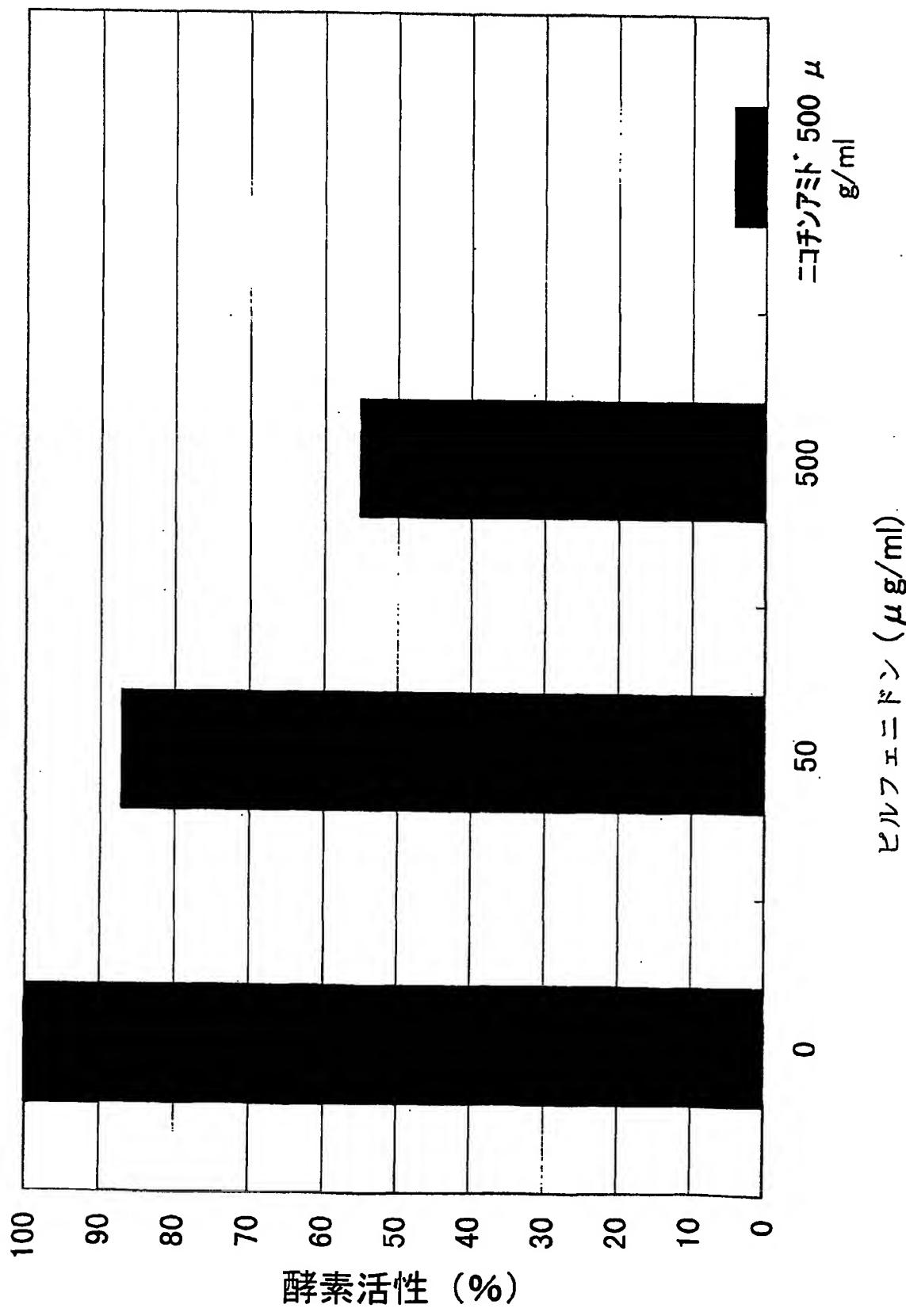
33/34

図33



34 / 34

図 34



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00935

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ A61K31/4412, A61P43/00, 1/16//C07D213/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl⁷ A61K31/00-4412, A61P43/00, 1/00-16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CAPLUS (STN), MEDLINE (PubMed)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/10712, A1 (MARGOLIN S B), 27 March, 1997 (27.03.97), & EP 866656 A1 & JP 11-512699 T2 & US 5962478 A	5-7, 9
Y		1, 2, 4-9
A		3
Y	WO, 96/27374, A1 (MARGOLIN S B), 12 September, 1996 (12.09.96), & EP 813409 A1 & JP 11-501911 T2 & US 6090822 A & US 6114353 A	1, 2, 4-9
A	US, 3974281, A (AFFILITATED MED RES), 10 August, 1976 (10.08.76), & JP 51-128437 A2 & GB 1529960 A	1-9
Y	GURUJEYALAKSHMI, G.; HOLLINGER, M.A.; GIRI, S.N. Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. Am J Physiol., February, 1999; 276(2 Pt 1): L311-318	1, 2, 4-9
Y	IYER, S.N.; GURUJEYALAKSHMI, G.; GIRI, S.N. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin	1, 2, 4-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
 20 April, 2001 (20.04.01)

Date of mailing of the international search report
 01 May, 2001 (01.05.01)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00935

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	hamster model of lung fibrosis. J Pharmacol Exp Ther., October, 1999; 291(1): 367-373.	
Y	CAIN, W.C.; STUART, R.W.; LEFKOWITZ, D.L.; STARNES, J.D.; MARGOLIN, S.; LEFKOWITZ, S.S. Inhibition of tumor necrosis factor and subsequent endotoxin shock by pirfenidone. Int J Immunopharmacol., December, 1998; 20(12): 685-695.	1,2,4-9
Y	PLUMPE, J.; STREETZ, K.; MANNS, M.P.; TRAUTWEIN, C. Tumour necrosis factor alpha--mediator of apoptosis and cell proliferation of hepatocytes. Ital J Gastroenterol Hepatol., April, 1999; 31(3): 235-243.	1,2,4-9
Y	WANG, W.; ZHOU, G.; HU, M.C., YAO, Z.; TAN, T.H. Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. J Biol Chem., 05 September, 1997; 272(36): 22771-22775.	1,2,4-9
Y	CHOWDHURY, G.G.; KARAMITSOS, C.; HERNANDEZ, J.; GENTILINI, A.; BARDGETTE, J.; ABBOUD, H.E. PI-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF. Am J Physiol., December, 1997; 273(6 Pt 2): F931-938.	1,2,4-9
Y	TSUJI, H.; MUKAIDA, N.; HARADA, A.; KANEKO, S.; MATSUSHITA, E.; NAKANUMA, Y.; TSUITSUI, H.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; KOBAYASHI, K.; MATSUSHIMA, K. Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in Propionibacterium acnes-primed IFN-gamma-deficient mice by a concomitant reduction of TNF-alpha, IL-12, and IL-18 production. J Immunol., 15 January, 1999; 162(2):1049-1055.	1,2,4-9
Y	FANTUZZI, G.; REED, D.A.; DINARELLO, C.A. IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. J Clin Invest., September, 1999; 104(6):761-767.	1,2,4-9
Y	SCHMITT, E.; RUDE, E.; GERMANN, T. The immunostimulatory function of IL-12 in T-helper cell development and its regulation by TGF-beta, IFN-gamma and IL-4. Chem Immunol. 1997; 68:70-85.	1,2,4-9
Y	SWANTEK, J.L.; COBB, M.H.; GEPPERT, T.D. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. Mol Cell Biol., November, 1997; 17(11): 6274-6282.	1,2,4-9
A	OLIVER, F.J.; MENISSIER-DE M. J.; NACCI, C.; DECKER, P.; ANDRIANTSITOHAINA, R.	3,8,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00935

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-κB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. EMBO J., 16 August, 1999; 18(16): 4446-4454.</p>	
A	<p>HA, H.C.; SNYDER, S.H. POLY (ADP-ribose), polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 23 November, 1999; 96(24): 13978-13982.</p>	3, 8, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00935

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet.)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00935

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The inventions as set forth in claims of the present international application each relates to drugs containing pirfenidone as the main ingredient. However, drugs containing pirfenidone as the active ingredient had been publicly known and thus use of pirfenidone per se as a drug cannot be regarded as a novel technical feature.

By examining in greater detail the inventions as set forth in claims of the present international application, it can be understood that these inventions relate to the following two techniques:

(1) a technique relating to the inhibition of apoptosis occurring from TNF- α mediated by IL-12, IL-18, IFN- γ , JNK and MAPK by using pirfenidone (claims 1, 2 and 4 to 7); and

(2) a technique relating to the inhibition of necrosis mediated by poly-ADP-ribose-polymerase by using pirfenidone (claims 3, 8 and 9).

As described above, apoptosis and necrosis differ from each other in pathway, which can be understood also by the description in the following document that cells originating in a poly-ADP-ribose-polymerase knockout mouse were protected from necrosis but not from apoptosis.

Document: HA, H.C.; SNYDER, S. H.

Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 23 November, 1999; 96(24): 13978-13982.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl. 7 A61K31/4412, A61P43/00, 1/16//C07D213/64

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl. 7 A61K31/00-4412, A61P43/00, 1/00-16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), MEDLINE (PubMed)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 97/10712, A1 (MARGOLIN S B) 27.3月. 1997 (27.03.97)	5-7, 9
Y	& EP 866656 A1	1, 2, 4-9
A	& JP 11-512699 T2	3
	& US 5962478 A	
Y	WO, 96/27374, A1 (MARGOLIN S B) 12.9月. 1996 (12.09.96)	1, 2, 4-9
A	& EP 813409 A1	3
	& JP 11-501911 T2	
	& US 6090822 A	
	& US 6114353 A	

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 20.04.01	国際調査報告の発送日 01.05.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 齋藤 恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3490 4P 9164

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	US, 3974281, A (AFFILITATED MED RES) 10. 8月. 1976 (10. 08. 76) &JP 51-128437 A2 &GB 1529960 A	1-9
Y	GURUJEYALAKSHMI, G. ; HOLLINGER, M. A. ; GIRI, S. N. Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. Am J Physiol. 1999 Feb;276(2 Pt 1):L311-318	1, 2, 4-9
Y	IYER, S. N. ; GURUJEYALAKSHMI, G. ; GIRI, S. N. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. J Pharmacol Exp Ther. 1999 Oct;291(1):367-373.	1, 2, 4-9
Y	CAIN, W. C. ; STUART, R. W. ; LEFKOWITZ, D. L. ; STARNES, J. D. ; MARGOLIN, S. ; LEFKOWITZ, S. S. Inhibition of tumor necrosis factor and subsequent endotoxin shock by pirfenidone. Int J Immunopharmacol. 1998 Dec;20(12):685-695.	1, 2, 4-9
Y	PLUMPE, J. ; STREETZ, K. ; MANNS, M. P. ; TRAUTWEIN, C. Tumour necrosis factor alpha—mediator of apoptosis and cell proliferation of hepatocytes. Ital J Gastroenterol Hepatol. 1999 Apr;31(3):235-243..	1, 2, 4-9
Y	WANG, W. ; ZHOU, G. ; HU, M. C. , YAO, Z. ; TAN, T. H. Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)- dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)- activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. J Biol Chem. 1997 Sep 5;272(36):22771-22775.	1, 2, 4-9
Y	CHOWDHURY, G. G. ; KARAMITSOS, C. ; HERNANDEZ, J. ; GENTILINI, A. ; BARDGETTE, J. ; ABBOUD, H. E. PI-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF. Am J Physiol. 1997 Dec;273(6 Pt 2):F931-938.	1, 2, 4-9

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	TSUJI, H. ; MUKAIDA, N. ; HARADA, A. ; KANEKO, S. ; MATSUSHITA, E. ; NAKANUMA, Y. ; TSUITSUI, H. ; OKAMURA, H. ; NAKANISHI, K. ; TAGAWA, Y. ; IWAKURA, Y. ; KOBAYASHI, K. ; MATSUSHIMA, K. Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in <i>Propionibacterium acnes</i> -primed IFN-gamma-deficient mice by a concomitant reduction of TNF-alpha, IL-12, and IL-18 production. J Immunol. 1999 Jan 15;162(2):1049-1055.	1, 2, 4-9
Y	FANTUZZI, G. ; REED, D. A. ; DINARELLO, C. A. IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. J Clin Invest. 1999 Sep;104(6):761-767.	1, 2, 4-9
Y	SCHMITT, E. ; RUDE, E. ; GERMANN, T. The immunostimulatory function of IL-12 in T-helper cell development and its regulation by TGF-beta, IFN-gamma and IL-4. Chem Immunol. 1997;68:70-85.	1, 2, 4-9
Y	SWANTEK, J. L. ; COBB, M. H. ; GEPPERT, T. D. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. Mol Cell Biol. 1997 Nov;17(11):6274-6282.	1, 2, 4-9
A	OLIVER, F. J. ; MENISSIER-DE M. J. ; NACCI, C. ; DECKER, P. ; ANDRIANTSITOHALINA, R. Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. EMBO J. 1999 Aug 16;18(16):4446-4454.	3, 8, 9
A	HA, H. C. ; SNYDER, S. H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 23;96(24):13978-13982.	3, 8, 9

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（別紙を参照。）

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第II欄の続き)

本国際出願の請求の範囲に記載されたものは、いずれもピルフェニドンを主成分とする医薬に関するものであるが、ピルフェニドンを有効成分とする医薬はすでに公知であるから、ピルフェニドンを医薬として用いること自体は、新規な技術的特徴とはなり得ない。

そして、本国際出願の請求の範囲に記載された発明をさらに詳細に検討すると、次の2つの技術に関するものであると理解される；

(1) ピルフェニドンを用いてTNF- α からIL-12, IL-18, IFN- γ 、JNK、MAPKを介して起こるアポトーシスを阻害する技術に関するもの

(請求の範囲1, 2, 4-7)

(2) ピルフェニドンを用いてポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼを介して起こるネクローシスを阻害する技術に関するもの

(請求の範囲3, 8, 9)

上記のように、アポトーシスとネクローシスの経路が異なるものであることは、ポリ-ADP-リボース-ポリメラーゼ ノックアウトマウス由来の細胞が、ネクローシスからは保護されたが、アポトシスからは保護されなかったという、下記文献の記載からも理解することができる。

文献：

HA, H. C. ; SNYDER, S. H.
Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell
death by ATP depletion.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov 23;96(24):13978-13982.